

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Departamento de Medicina Interna**



**TESIS DOCTORAL**

## **Sistemas de perfusión en órganos aislados**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Juan Pedro Simón Arnanz**

**Madrid, 2015**

Juan Pedro Simón Arnanz

70  
982  
043



X-53-076886-X

SISTEMAS DE PERFUSION EN ORGANOS AISLADOS

Departamento de Medicina Interna  
Facultad de Medicina  
Universidad Complutense de Madrid  
1982



BIBLIOTECA



© Juan Pedro Simón Arnanz  
Edita e imprime la Editorial de la Universidad  
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía  
Noviciado, 3 Madrid-8  
Madrid, 1981  
Xerox 9200 XB 480  
Depósito Legal: M-36706-1981

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE  
FACULTAD DE MEDICINA

TESIS DOCTORAL

SISTEMAS DE PERFUSION  
EN ORGANOS AISLADOS

*Director: Prof. Dr. D. Felipe de la Cruz Caro*  
*Doctor D. Juan Pedro Simón Aranz*



DEPARTAMENTO DE CIRUGIA  
Prof. Dr. D. Felipe de la Cruz Caro

CIUDAD SANITARIA DE LA SEGURIDAD SOCIAL  
"1º DE OCTUBRE"  
M A D R I D

D. Felipe de la Cruz Caro, Catedrático - Jefe del Departamento de Cirugía de la  
Ciudad Sanitaria de la Seguridad Social "1º de Octubre". Universidad Complutense. Madrid.

CERTIFICA: *Que D. Juan Pedro Simón Aranz, ha realizado bajo su tutela y  
dirección en el Departamento de Cirugía ( Servicio de Cirugía General )  
el trabajo titulado:*

**" SISTEMAS DE PERFUSION  
EN ORGANOS AISLADOS "**

*Que considera satisfactorio para ser presentado como Tesis Doctoral,  
en la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.*

*Para que así conste donde convenga, firmo el presente certificado  
en Madrid a 1 de Noviembre de 1.978*

*Fdo. D. Felipe de la Cruz Caro*

En nuestro deseo de lograr la titulación de Doctor en Medicina y Cirugía, en el año 1972 formamos un grupo de investigación encaminado al estudio y mejor comprensión de fenómenos clínicos. Este grupo, formado por internistas, cirujanos, biofísicos, y bioquímicos, ha venido trabajando desde entonces ininterrumpidamente, con unos resultados, creo que, altamente esperanzadores; lograda la continuidad imprescindible gracias a la estrecha amistad que une a todos nosotros, así como al espíritu universitario aportado por el Catedrático de Patología y Clínica Quirúrgica, Prof. Dr. D. Felipe de la Cruz Caro, sin cuyo estímulo no hubiese sido capaz de materializar en la presente Tesis, los trabajos realizados.

El tiempo transcurrido y sobrepasadas con mucho las líneas básicas proyectadas originalmente nos permite en el momento actual, estar en disposición de exponer, recogido en éste trabajo, parte de lo que personalmente he aportado al equipo de investigación, como base para la elaboración de la presente tesis doctoral.

El tema elegido, ha sido el de "SISTEMAS DE PERFUSION EN ORGANOS AISLADOS", tema no muy conocido, pero que una vez desarrollado, ofrece innumerables posibilidades de investigación fuera del ámbito de los límites establecidos por nosotros.

Finalmente, quiero hacer patente mi agradecimiento junto al Prof. Dr. D. Felipe de la Cruz Caro, Director de la presente Tesis, a:

P. Esponda.- Instituto Cajal, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid

L. Guerra.- Departamento de Anestesia. Ciudad Sanitaria de la Seguridad Social  
"La Paz". Madrid

A.M. Municio.- Departamento de Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad Complutense  
de Madrid

P. García Barreno.- Departamento de Medicina y Cirugía Experimental. Ciudad Sanitaria  
Provincial "Francisco Franco". Madrid

Personas y Centros que tan generosamente me han ayudado y acogido.

## INDICE

INTRODUCCION .....	Págs.	1 - 3
REVISION HISTORICA .....	"	4 - 26
HIPOTESIS .....	"	27 - 28
PLANTEAMIENTO .....	"	29 - 32
MATERIAL Y METODO .....	"	33 - 101
RESULTADOS .....	"	102 - 143
DISCUSION .....	"	144 - 158
CONCLUSIONES .....	"	159 - 160
RESUMEN .....	"	161 - 163
BIBLIOGRAFIA .....		



## INTRODUCCION





La cirugía actual, que ha alcanzado objetivos insospechados con la incorporación de una tecnología altamente compleja y eficaz, permite el planteamiento de problemas cuya resolución correcta, va a constituir un enclave muy importante dentro de la cirugía inmediatamente futura.

Concretamente, el trasplante de órganos, es sin duda el gran reto de la cirugía actual, la eficacia de su empleo ha sido reconocida mundialmente desde hace varios años y la viabilidad lograda en el reemplazamiento de huesos, córneas o riñones, nos hace pensar en la posibilidad de sustituir cualquier otro tipo de órgano, siempre que los problemas inmunológicos, que determinan en definitiva dicha viabilidad, puedan superarse sin el pago de un alto tributo por parte del receptor humano.

Sin embargo, el primer obstáculo que surge indetectablemente a la hora de sistematizar el uso de trasplantes de órganos, es el de la obtención y conservación de los mismos. Es evidente que teóricamente, la solución idónea, vendrá dada por la consecución de un banco de órganos, en el que pudieran conservarse los mismos con morfología y fisiologismo indemne, durante un tiempo lo más prolongado posible.

Actualmente, para el logro de estos fines contamos con dos amplias posibilidades:

a) Procedimientos de conservación estructural, con pérdida transitoria de su función, pero con capacidad de recuperación de la misma en un momento determinado, como ocurre con los sistemas basados en la crioconservación.

b) Procedimientos que aseguran una función permanente, a la vez que una plena integridad morfológica.

Estos últimos objetivos, pueden lograrse por dos mecanismos diferentes; por INCUBACION (como en el caso de células productoras de insulina), mantenido durante un determinado intervalo de tiempo en un medio nutritivo adecuado y por PERFUSION continuada del medio nutritivo correspondiente, que se logra a su vez de dos formas, o bien por perfusión mecánica (sistemas de bombeo artificial) o bien por perfusión fisiológica (utilizando el complejo cardio-pulmonar del propio animal).

Todo este gran apartado, mencionado en último lugar, osea, *"el que obtiene la supervivencia de órganos aislados, con pleno rendimiento fisiológico y preservando su sustrato estructural, a expensas de una perfusión continuada del medio nutritivo adecuado"*, es el que desarrollaremos a lo largo del presente trabajo.

Quizás, no sea un parcela muy espectacular dentro del campo de la cirugía experimental, pero creemos sin embargo que puede servir de base para el desarrollo e incluso para la habituación con técnicas poco conocidas, que pueden contribuir al estudio de problemas biológicos básicos y que exigen una absoluta rigurosidad en la obtención de datos.

Si logramos unos modelos anatómicos ideales, libres a su vez de influencias de otro orden (nerviosas, hormonales, humorales, etc.) habremos conseguido junto a las ventajas de la experimentación directa sobre órganos "in situ", un sistema ideal para la experimentación bioquímica, abriéndose de esta forma frente a nosotros un horizonte de posibilidades

casi ilimitadas.

Todo ésto, nos hace pensar que cualquier intento de cirugía futura, encaminado a la sustitución de órganos o sistemas, o incluso a la obtención y empleo de órganos de puradores, pilotos o marcapasos y hasta la misma fisiología y biología experimental, deberá conocer y desarrollar al máximo la problemática inherente a la perfusión de órganos aislados, como paso previo para la obtención de modelos anatómicos válidos y perfectamente homologables.

2/21

REVISION HISTORICA

#### REVISION HISTORICA DEL PROBLEMA

J.J. César La Gallois señaló en 1812, que el reemplazamiento del corazón mediante un sistema de bombeo artificial, capaz de asegurar un aporte continuo de sangre arterial o bien un sustituto aceptable de ésta, podría mantener cualquier parte aislada del organismo con características de viabilidad y de forma indefinida. Al principio, este postulado de bioingeniería es aún válido aunque de hecho no se haya logrado tal propósito en su totalidad.

Se han empleado desde hace varias décadas diferentes técnicas para la perfusión de órganos totales. Probablemente una de las más primitivas fue la descrita por Langendorff en el año 1895. El dispositivo diseñado por dicho autor, consta de una columna que contiene un reservorio y un tubo de sifonaje que lo conecta al órgano. El sistema no es pulsátil y el líquido de perfusión no recircula por el órgano, a pesar de lo cual y aun en la actualidad muchos investigadores siguen refiriéndose al empleo de dicho método. Webb (108) y Redo Dime (93). Posteriormente y en una época más reciente Humphries (66) ha presentado una modificación del método anterior conectando tres reservorios entre sí mediante una serie de conexiones a un tubo de perfusión, del cual, situado sobre un sistema de bombeo rotatorio perfunde el líquido en la aorta de la preparación. A pesar de describir Langendorff su sistema de perfusión hace 75 años, perdura todavía su vigencia actual, debido fundamentalmente a su simplicidad y a verificar una función muy definida, "la perfusión por arrastre mecánico".

Knowlton y Starling describieron en 1920 un dispositivo que permitía la autoperfusión cardíaca (70). La sangre

se retiraba del ventrículo izquierdo a través de un tubo de resistencia ajustable y potencialmente capaz de ser medido, fluía a continuación por un sistema de sifonaje en el cual podían medirse directamente el gasto cardíaco, de aquí pasaba a un reservorio en donde era calentada, para a continuación retornar a través de otro tubo a la aurícula derecha. En esta preparación conocida universalmente como preparación de Starling, la totalidad de la sangre eyectada por el ventrículo izquierdo, pasaba a través del circuito artificial con la única excepción de la empleada en el gasto coronario. Con este sistema Starling y su grupo fueron capaces de mantener cora - zones de mamíferos latiendo espontáneamente durante varias horas. El mismo autor pudo estudiar posteriormente la secreción de orina en un riñón aislado empleando el fundamento de ésta misma preparación.

En la misma línea de la perfusión cardíaca, deben citarse los nombres de Martin (85) que perfundió los vasos coronarios "in situ" así como el estudio sobre corazones aislados de mamíferos para el estudio del efecto de digitálicos, Kuluabko (73) que estudia el problema de la resucitación cardíaca, Barcroft y Dixon (9), describiendo un sistema para el estudio del metabolismo "gaseoso" en el corazón de perro aislado y perfundido, Hooker (65) indicando los efectos del calcio y del potasio sobre los centros respiratorios y cardíaco en sistemas de perfusión medular, Burrows (28) que desarrolla un método para el aporte continuo de diferentes medios a cultivos tisulares "in vivo", a la vez que estudia la actividad de células musculares cardíacas aisladas, observando como un incremento en la concentración de potasio en una solución ringer causaba el cese del latido cardíaco en corazones perfundidos de conejos, o como disminuyendo la concentración de dicho ión se provocaba un aumento del ritmo, mientras que si ésta reducción continuaba por debajo de un cierto valor umbral

provocaba su parada. Clark (35) en la misma época de Starling se refirió al efecto de los cambios de temperatura sobre el funcionamiento del corazón aislado.

A lo largo de la primera mitad de este siglo se han sucedido los trabajos de forma considerable en el área de la perfusión. En la edición de 1920 del libro de MacLeod "fisiología-bioquímica", se acepta que una preparación perfundida de riñón aislado produce ácido hipúrico, así como que cuando es el hígado el perfundido se acumula urea de forma gradual. Se conocía igualmente que mientras se hiciese pasar oxígeno a presión a través de la sangre contenida en el reservorio del circuito, podría lograrse viabilidades aceptables. Por otro lado los estudios de Bainbridge y Evans (5) y los de Verney y Starling (106), demostraron que el acoplamiento de riñones aislados a una preparación corazón-pulmón, formaban orina durante cortos espacios de tiempo.

A partir de 1930 se acentúa el interés general por este tema, apareciendo un enfoque diferente respecto a la utilización de sistemas de perfusión de órganos aislados. Carrel (31) señaló que las clásicas técnicas de perfusión eran el método más seguro para producir una colonización bacteriana. El mismo Carrel y Lindbergh (31) describieron un aparato que ofrecía por primera vez la posibilidad de esterilización. Otras de las miras de este autor fue la de desarrollar un sistema suficientemente capaz para asegurar el aporte de grandes cantidades de líquido de perfusión, tanto a las preparaciones de órganos aislados como a las de cultivos celulares. De esta cooperación surgió el sistema de perfusión de órganos conocido como sistema Linbergh (76-77-78), que fue el primer aparato compacto y de perfusión continua pulsátil en el que los estudios pudieron realizarse bajo condiciones de esterilidad.



Carrel en su libro publicado en 1938, señaló que el tiroides, los ovarios, el corazón, los riñones y el páncreas podían mantener su actividad funcional y arquitectura estructural de acuerdo con la composición del líquido de perfusión. Este autor estuvo convencido de que el diseño de Linberng, significaba un replanteamiento en la metodología de la investigación fisiológica.

Debe admitirse que en todos los experimentos de perfusión de órganos, la víscera que forma parte del sistema de perfusión, representa una estructura totalmente denerada, ello por tanto no significa que los resultados obtenidos con tales experiencias puedan ser aceptados como ejemplo de lo que ocurre en el individuo normal. Es obvio que ciertos principios básicos son comunes a la totalidad de los trabajos de perfusión. La elección del animal, la técnica de la operación, la anestesia, los aparatos y líquidos de perfusión, la monitorización y vigilancia de la preparación, son factores técnicos de la mayor importancia, lo mismo ocurre con el "volumen de cebamiento" o mínima cantidad de líquido a perfundir necesaria para "cebar" la totalidad del sistema constituido por tubos y reservorios.

Lo primordial de este tipo de experiencias, es evitar la hipoxia en el órgano que está siendo perfundido. Este problema tiene especial trascendencia por ejemplo en el hígado del perro, que nos obliga a hacer pasar la totalidad de la sangre por la arteria hepática, o en el caso de la perfusión de otro tipo de vísceras más pequeñas, en la que es imprescindible utilizar los segmentos de aorta correspondientes al nacimiento de las arterias específicas. La mayoría de los órganos bajo perfusión, reaccionan mal a la hipoxia sea cual sea el tiempo de la experiencia en que esta se presente. La recuperación sin embargo será posible siempre que la alteración

hipóxica sea limitada y posteriormente se corrija el defecto en la perfusión, ya que la no consecución de la misma sería causa fundamental del fracaso de esta técnica.

En el caso de que el aislamiento del órgano en cuestión sea imposible sin interrumpir temporalmente el aporte arterial, dicho órgano debe enfriarse con el fin de reducir al máximo el desarrollo de lesiones hipóxicas graves, habiéndose comprobado que con el enfriamiento a 15° se logra la prevención total de los cambios que induce la isquemia momentánea a temperatura normal. Como ya hemos dicho en repetidas ocasiones, la hipoxia es asimismo un factor decisivo respecto a la viabilidad del órgano donado y que a su vez puede estar condicionado por alteraciones previas neuroendocrinas que provocan un estado de micro-vaso-constricción, responsable igualmente de lesiones irreversibles en el organismo "donante",

Otro factor de alto riesgo, en cuanto que es causa de alteraciones irreversibles, lo constituye el manejo no cuidadoso de las estructuras. No cabe duda de que en teoría, el líquido ideal de perfusión es la sangre autóloga no diluida, de todos modos como base para diversos proyectos de investigación actual en sistemas de perfusión de órganos aislados, se emplea cada vez más la hemodilución, debido fundamentalmente al hecho de que no siempre es posible obtener un volumen de sangre para "cebamiento" suficiente.

Es conveniente que la totalidad de los elementos que han de ponerse en contacto con la sangre sean desechables. Determinados tubos de plástico, presentan ciertas impurezas o características estructurales que originan defectos de los téreos sobre la sangre, razón por la que debe reducirse a un

mínimo imprescindible el material plástico en contacto con la misma.

Los sistemas de conducción exagerados, lejos de ofrecer una amplia capacidad de transporte, solo sirven en definitiva para aumentar las necesidades del volumen de cebamiento. Esto es de particular importancia cuando se están llevando a cabo estudios bioquímicos apoyados en técnicas de dilución isotópicas.

Parece ser que un grupo de 4 personas constituye el ideal para formar un equipo de investigación en este campo. Es esencial que una vez comenzada la perfusión se preste la máxima atención a:

- 1?- Aporte de oxígeno
- 2?- Nivel de sangre en el reservorio
- 3?- Cantidad del drenaje venoso

En todo diseño experimental de éste tipo, la respuesta de los diferentes órganos al comienzo de la técnica, invariablemente presenta durante un período inicial de 30 á 60 minutos un fracaso aparente con una recuperación posterior. Este hecho es de gran trascendencia, pues debería admitirse que una vez puesto en marcha un modelo no debería procederse al estudio sistemático proyectado hasta que la preparación se estabilizase y tras esos primeros minutos de incertidumbre obligada, sabiendo por dicha razón que los resultados obtenidos en dicha fase serán casi invariablemente dignos de poca fiabilidad. Por otra parte este fenómeno iniciado de recuperación representa en sí una circunstancia de considerable interés, circunstancia que no ha sido objeto de una consideración adecuada tal y como nosotros creemos que se merece. Es casi seguro que una hipoxia relativa provocada por

la actuación mecánica, así como el trauma quirúrgico "per se" contribuirán a un estímulo simpático y a la liberación de catecolaminas igualmente dignos a tener en cuenta en esta fase inicial.

Existen dos técnicas para la perfusión de órganos, aceptadas en base a su validez comprobada en el estudio de la dinámica funcional de un órgano determinado. Una es la técnica de perfusión "in situ", mediante sangre arterial autóloga y que es aplicable para el estudio de la función glandular o de pequeños órganos susceptibles de recibir una pequeña fracción del gasto cardíaco del animal. De esta forma, sustancia-problema, con capacidad de estímulo o de inhibición, pueden introducirse en el sistema sanguíneo que perfunden al órgano, a la vez que sufren una suficiente dilución en la sangre sistémica, tras el paso a través del órgano perfundido de tal manera, que la recirculación de las mismas no comprometerán el control experimental en la sangre del sistema por aumento de la concentración.

La segunda técnica, denominada "método del órgano piloto", es aplicable a órganos que reciben una gran fracción del gasto cardíaco, tal como ocurre en el caso del hígado. En estas circunstancias se realizan conexiones vasculares entre la circulación de un animal grande y anestesiado, y el hígado de un animal más pequeño de la misma especie. El hígado del animal más pequeño ("hígado piloto") privado de su efluente venoso será sumergido en un baño de su propia sangre, continuamente retirada e introducida en el animal mayor. La sustancia-problema pueden introducirse bien en la arteria hepática o bien en la vena porta del hígado piloto, pero el pequeño volumen de dicho órgano y la pequeña cantidad del flujo sanguíneo en relación con el otro animal enmascararán los efectos de la recirculación.

Las sustancias que normalmente se adicionan con uno u otro fin al medio de perfusión son elementos tan variados como pueden ser dextrosa, hormonas, antibióticos, cofactores enzimáticos, inhibidores metabólicos, aminoácidos, polipéptidos, ácidos grasos, agente tensioactivos, trazadores, etc., etc.

Junto a todo lo anterior hay una serie de condicionantes tales como la temperatura, el pH, osmolaridad, tensiones de  $O_2$  ó de  $CO_2$ , que son fundamentales a tener en cuenta para el desarrollo global de la perfusión.

Los componentes físicos de la mayoría de estos sistemas incluyen cánulas o catéteres que aseguran la conexión con el sistema vascular, un reservorio de sangre, una bomba, un oxigenador, un sistema de filtros para el medio global de perfusión y mecanismos apropiados para la regulación o monitorización de la presión o flujo del sistema.

La finalidad del sistema de bombeo o impulsor del medio de perfusión, es convertir la energía proporcionada por una fuente mecánica o eléctrica en energía cinética del fluido a perfundir. Tales sistemas o bombas pueden dividirse en sistemas de desplazamiento positivo o no positivo.

a) Bombas de desplazamiento positivo. En este tipo de sistema un mecanismo rotatorio o bien de reciprocidad, es el que se encarga de mover un líquido de forma progresiva a través de un sistema específico, equipado con una serie de dispositivos que impiden tanto el atrapamiento como el reflujo. El gasto de la bomba ha de ser relativamente independiente de las variaciones en la presión sistémica distal o en la resistencia. La monitorización del flujo es relativa-

mente independiente de las variaciones en la presión sistémica distal o en la resistencia. La monitorización del flujo es relativamente simple. En las bombas de desplazamiento fijo, en las que el volumen de oferta está predeterminado, el gasto podrá variarse exclusivamente mediante cambios en la velocidad de bombeo. En los diseños de desplazamiento variable, la estructura interna de la bomba puede modificarse siendo por tanto variable la velocidad y el volumen de oferta lo que permite a su vez modificar el gasto de la bomba.

Las bombas de desplazamiento positivo rotatorio, presentan diferentes diseños, pero en conjunto están formadas por una unidad rotatoria que atrapa el líquido adherente dentro de la bomba y lo desplaza hacia el sistema de descarga. En general se exige un acoplamiento exacto de las partes móviles con el fin de evitar el reflujo, no necesitándose sistemas valvulares adicionales. Estas bombas tienen generalmente una capacidad discreta o baja aunque poseen la ventaja de ser sencillas, económicas y compactas. La mayoría de las perfusiones de órganos se realizan habitualmente con bombas de este tipo, esencialmente las diseñadas a base de rodillos. Otra ventaja importante de este tipo de bombas es la de emplear un sistema de tubos desechable.

Las bombas de desplazamiento positivo por mecanismo de reciprocidad tienen generalmente un pistón que alternativamente llena y vacía una cámara, dando lugar a un flujo pulsátil, pero necesita a su vez un sistema valvular que asegure un flujo uni-direccional. Tales sistemas tienen normalmente un volumen de oferta predeterminada, con lo que su gasto es igual a dicho volumen de oferta en función de la

velocidad del ciclo. Estas bombas suelen ser caras complejas y con tendencia a la producción de hemólisis. En la práctica diaria de laboratorio han sido reemplazadas por el tipo anteriormente citado, sin embargo en los últimos años los investigadores interesados en conseguir flujos pulsátiles están reactivando la investigación y puesta a punto de este tipo de diseños.

b) Bombas de desplazamiento no positivo. Los sistemas industriales de éste tipo usados más frecuentemente, son sistemas simétricos (diseños de desplazamiento no positivos), que transmiten una energía simétrica para el desplazamiento de un líquido mediante un sistema generalmente impelente. Tales bombas suelen ser diseños de centrifugadoras, dependientes de altas velocidades de impulsión y que verifican tasas determinadas de aceleración en un líquido. Este tipo de bombas simétricas no crean un ambiente interno positivo, sino que la tasa de desplazamiento varía mediante alteraciones en la resistencia al flujo. Hasta la actualidad estos sistemas crean violentos vórtices, cavitaciones y altos índices de hemólisis, por lo que han sido prácticamente desechadas.

El primer diseño de tipo centrífugo fue ideado para su aplicación en sistemas de perfusión de órganos por Saxton y Andreuw en 1960. Estos autores lo consideran ventajoso debido a su rendimiento inherente de auto-regulación en el par presión-flujo así como por la ausencia de superficies ocluyentes por contacto y sistemas valvulares.

Posteriormente Blackshear y col. en 1966 y Rafferty y col. en 1968 diseñan una bomba centrífuga utilizando gran-

des superficies de deslizamiento para impartir en energía cinética a la sangre. En 1970 Bernstein diseña un sistema similar utilizando una bomba centrífuga impelente de tipo abierto. En este diseño el líquido de perfusión rota dentro de la bomba a casi la misma velocidad que las estructuras impelentes y de forma aproximada a un vórtice sólido con lo que logra una mínima interfase sangre-superficie, pérdida por succión, generación de calor y hemólisis.

Las ventajas de las bombas centrífugas de tipo impelente abierto, incluyen la ausencia de perfiles abruptos o de superficie de cierre por contacto, a la vez que operan a distintas tasas de flujos y velocidades, bajas presiones de cebamiento y ausencia de sistemas valvulares, ofreciendo una construcción compacta, tamaño pequeño, bajo peso y mínimo ruido, pudiendo funcionar en una amplia variedad de posibilidades en cuanto a la presión y al flujo. Junto a ello en algunos diseños de éste tipo hay una presión constante para cualquier gama de revoluciones, viniendo determinada la tasa del flujo por la resistencia de los tejidos periféricos. Estos diseños deben servirnos fundamentalmente en sistema de perfusión destinados a mantener una presión fija, por lo que creemos serían los ideales en sistemas de perfusión de órganos aislados.

Con respecto a los factores que han de condicionar la selección de un determinado sistema de bombeo pensamos que deben ser incluidos:

1. Tasa de flujo y presión puntal.
2. Materiales que han de estar en contacto con la sangre y la producción subsiguiente por tanto de trombosis y traumatismos.



3. Pulsatilidad en el flujo.
4. Viabilidad, costo, tamaño, ruido y facilidad de esterilización.

Los requerimientos de flujo y presión en los sistemas de perfusión biológicos son generalmente bastantes modestos en comparación con la capacidad que ofrecen cualquiera de los mecanismos de bombeo disponibles y señalados con anterioridad. De ahí que tanto las características de flujo y presión no sean factores primordiales en la elección de dichos sistemas de bombeo.

La estimación del trauma sanguíneo se verifica en base a las determinaciones de hemólisis "in vitro" inmediatas, dado que la destrucción eritrocítica es fácilmente identificable y se considera normalmente como un índice de agresión a los demás elementos tanto celulares como plasmáticos.

Para perfusiones orgánicas se acepta como límite superior un índice de hemólisis menor de 0,1 gr. de Hb. libre por 100 l. de sangre bombeada.

Determinadas investigaciones con respecto a los factores mecánicos implicados en las hemólisis traumáticas, sugieren que el dato de lisis del hematíe "in vitro", inmediato, representa una fracción de la alteración total de los eritrocitos, donde la interacción con las superficies expuestas parece ser el factor más importante a tener en cuenta, mientras que los eritrocitos soportan con una relativa tolerancia las presiones positivas intermitentes, las fuerzas de deslizamiento y las turbulencias. De esto deducimos que bombas con sistemas valvulares o con superficie de oclusión por contacto, provocan mayor destrucción celular que las bombas carentes de ta-

les elementos. Los efectos de la bomba y otros componentes del sistema de perfusión sobre el complejo mecanismo de la coagulación también deben de ser tenidos en cuenta. Superficies de contacto tan limitadas como es el caso de una simple válvula protésica cardíaca, originan una significativa alteración en las plaquetas. Junto a ello las superficies extrañas provocan la desnaturalización de ciertos componentes, en especial el fibrinógeno, a la vez que originan el desencadenamiento de "reacciones de superficie", de gran importancia en los sistemas de la coagulación o en el de las quininas, pudiendo colegirse de todo ello que la extensión de la superficie expuesta es trascendental en el desarrollo de todo este tipo de alteraciones.

A su vez las propiedades intrínsecas de dichas superficie de contacto (dejando aparte un factor tan importante, como es el de la extensión de la superficie) influirán marcadamente en favor o en contra de dichas alteraciones, en particular ciertos materiales que presentan baja energía libre de superficie, altas cargas electronegativas o que incorporan materiales anticoagulantes.

Teleológica y filogenéticamente, el flujo pulsátil parece ser el factor esencial en la distribución de la sangre arterial, dada la capacidad contráctil e intermitente del músculo cardíaco y que puede considerarse como una bomba natural de desplazamiento positivo y de reciprocidad. Más aún, la evolución filogenética de un sistema circulatorio aislado parece que ha coincidido con unos requerimientos para un flujo pulsátil, quizás como un mecanismo para impulsar la linfa desde los tejidos periféricos al sistema venoso. Algunos de los efectos perjudiciales, atribuidos a flujos pulsátiles son:

- Incremento de la producción de renina
- Incremento de la resistencia periférica sistémica
- Incremento de la resistencia vascular pulmonar, aún cuando se acompañe de un adecuado intercambio gaseoso
- Disminución de hasta un 25% en el consumo de  $O_2$
- Incremento en la acidosis láctica
- Disminución del gasto urinario y de la excreción de Na
- Disminución en el retorno linfático
- Disminución de la sensibilidad en los baro-receptores
- Atrapamiento de sangre en el territorio esplácnico

Sin embargo la necesidad absoluta de un flujo pulsátil para la supervivencia del organismo está muy lejos de ser cierta. La representación clínica de tal aseveración, se pone de manifiesto en la denominada "enfermedad sin pulso" o "enfermedad de Takayuso", en estenosis severas pulmonares o aórticas, en las estenosis arterioescleróticas, en pacientes con cardiopatías congénitas a los que se les ha practicado un shunt cavo pulmonar tipo Glenn (anastomosis entre la vena cava superior y la arteria pulmonar) y en casos de bay-pass total en cirugía a corazón abierto. En todos estos casos la pulsatilidad del flujo está amortiguada o prácticamente abolida, presentando algunos de éstos pacientes una hipertensión arterial de origen renal cuyo sustrato etiopatogénico responsable sería el incremento en la liberación de renina (tal como indicábamos que ocurría en condiciones experimentales).

Frente a las experiencias más primitivas (Hooker (65) del año 1910 o las de Gesell (54) en 1913) en las que se sugería una disminución de ciertos parámetros en la función renal con flujos no pulsátiles, estudios posteriores de Mandelbaum (83) en (1965) demuestran que tanto el flujo sanguíneo renal como el flujo plasmático y la tasa de filtrado glomerular, no dependen

del carácter pulsátil o de la perfusión. Es más en dicho trabajo se señala que tanto el volumen de orina como la excreción de Na, disminuyen igualmente en perfusiones renales aisladas, tanto con flujos pulsátiles como uniformes. El gran desarrollo alcanzado en la perfusión de órganos aislados y su conservación dirigida hacia futuros trasplantes, han estimulado una serie de nuevas experiencias sobre las propiedades de diferentes tipos de flujos que han sido evaluados respecto a la capacidad de los órganos perfundidos para reanudar una función normal con secutiva a su reimplantación. Long (81) y Mandelbaum y col. (83) señalan la indiferencia de las características del flujo con respecto a la funcionalidad o no del órgano reimplantado.

Cabe insistir, en que operaciones derivativas tipo Glenn, que provocan una ausencia crónica de pulso en el flujo pulmonar se toleran perfectamente por muchos pacientes en períodos de tiempo superiores a los 10 años. Respecto a la repercusión de la situación de ausencia de pulso, tal como ocurre en el bay-pass cardiopulmonar total, las mediciones del flujo y gasto en el conducto torácico, no sufren modificaciones, pues dichos parámetros parecen depender exclusivamente de la presión arterial media. Iguaes consideraciones pueden hacerse con respecto a las concentraciones de lactato o de catecolaminas en plasma.

En resumen los datos disponibles, tanto experimenta les, como humanos, no parecen inferir mayor trascendencia a la problemática previamente planteada con respecto a la característica de pulsatilidad, tanto en lo que respecta a la perfusión corporal total como a la de órganos aislados, a excepción del riñón en el que la variación de renina sí que aparece como un factor a considerar de la máxima importancia.

En la totalidad de los sistemas de perfusión es imprescindible una serie de conexiones que garanticen un medio

efectivo tanto del drenaje venoso, como del aporte de sangre arterializada. Las relaciones entre presiones y flujo del sistema de catéteres es quizás uno de los factores más dignos de tener en cuenta, particularmente cuando los vasos son de pequeño diámetro y los catéteres de longitudes relativamente grandes.

Junto a la influencia del diámetro interno y de la longitud, es igualmente importante el papel de la configuración de la entrada y salida del catéter, para evaluar la resistencia del circuito. Esta resistencia originada por dicha entrada, es tal, que puede ser responsable de hasta el 40% de la pérdida de presión en el circuito. Otro hecho destacable es la influencia del catéter sobre la hemólisis provocada en el sistema de perfusión. Lógicamente, cuanto menor sea el diámetro interno de éste y mayor la velocidad del flujo, habrá un aumento proporcional de la hemólisis provocada. Cuando la velocidad sobrepase los 2000 cm<sup>3</sup> por segundo, esta hemólisis inducida por las propias fuerzas tangenciales del fluido aumentan significativamente el índice hemolítico.

En un esfuerzo para disminuir la resistencia y hemólisis ocasionadas por el catéter, se han desarrollado cánulas rígidas y de paredes finas, comprobándose que los mejores resultados se han obtenido con los contruidos con astómeros de poliuretanos, fibra de vidrio y acero.

Una serie de consideraciones adicionales deben de hacerse con respecto a la cateterización venosa y a su drenaje apropiado. El drenaje por simple gravedad a partir de una vena seccionada, se ha descrito clásicamente, como el método más fácil de evitar cualquier traumatismo a la sangre o incrementar innecesariamente la resistencia venosa. Sin embargo existen casos en que la propia metodología provoca un colapso venoso,

razón por la que muchos autores consideran necesario introducir algún mecanismo adicional que asegure un drenaje venoso con rango fisiológico en las presiones de salida.

Queda únicamente añadir que con el fin de reducir al máximo las pérdidas de presión por fricción, deberá emplearse el mayor diámetro interno posible, a la vez que cuanto más rígida sea la pared del catéter habrá una menor disipación en la presión de desplazamiento, condicionamiento que nos obligará siempre que sea posible al uso de sistemas de la máxima rigidez.

En resumen el diseño de los catéteres es un aspecto digno de tener en cuenta, aunque a veces se desprecie en el sistema de perfusión, por eso insistimos en que deberá presentar la máxima luz y la mínima longitud posible, paredes ultrafinas y rígidas, así como unos bordes de entrada lo más romos posibles. Las superficies internas no traumáticas y antitrombogénicas, lograrán disminuir al máximo la hemólisis y la trombosis. Por tanto los flujos pulsátiles llevarán obligadamente a un marcado incremento en la pérdida de energía cuando se utilicen catéteres estrechos y distensibles.

La supervivencia de cualquier tejido o de órganos sometidos a un sistema de perfusión, insistiremos una vez más, estará siempre en función de una oxigenación adecuada. Los requerimientos de un oxigenador son similares a los que hemos descrito para los sistemas de bombeo, con las limitaciones específicas adicionales de un volumen mínimo de cebamiento y la necesidad de una superficie suficiente que nos asegure un intercambio gaseoso adecuado, ambos hechos, cebamiento y superficie de intercambio gaseoso, llevan invariablemente a un incremento en los problemas derivados de la hemólisis y de la trombosis.

Se han realizado verdaderos esfuerzos para la utilización del tejido pulmonar biológico en las perfusiones de órganos, empleando pulmones homólogos (Barnes y col. (11) 1968) y Blumenstock y col. (21), líneas de investigación sobre las que insistiremos a lo largo de nuestro trabajo. Sin embargo las perfusiones de órganos aislados utilizan de forma standard diseños de oxigenación extracorpórea, diseños, que en líneas generales pueden clasificarse en tres grandes grupos:

- Oxigenadores de burbujas
- Oxigenadores laminares
- Oxigenadores de membrana

De estos tres modelos enumerados, los dos grupos primeros representan los diseños de utilización clásica, tanto a nivel clínico como de investigación, mientras que los oxigenadores de membranas están aún en fase experimental a pesar de ser a nuestro entender los más fisiológicos.

La utilización práctica de la producción de pequeñas burbujas, con el fin de oxigenar la sangre, está basado en un sistema de atrapamiento efectivo de las mismas, creado por Clack en 1950 (35), así como la posterior aplicación de este hecho en un oxigenador de aplicación clínica diseñado por De Wall en 1956 (41). Este sistema, fue posteriormente modificado, quedando constituido por un reservorio helicoidal en el que se efectuaba la oxigenación por burbujas y un sistema de atrapamiento de las mismas desarrollado por Cooley (1957-58), este sistema de oxigenación es sin duda el más popular de los empleados para intervenciones a corazón abierto en los últimos 20 años.

Las desventajas más destacables están planteadas por los problemas derivados de la eliminación del  $\text{CO}_2$  bajo diferentes condiciones, así como el alto índice de hemólisis que produce.

Los diseños laminares, tanto estacionarios como rotatorios, figuran entre los dispositivos primeramente empleados para la oxigenación. Los más conocidos, tales como los empleados en la Clínica Mayo en 1960, utilizan diferentes versiones de este principio. Su fundamento es la laminación sobre una superficie, de un film lo más delgado posible de sangre que queda expuesto a un ambiente de  $O_2$ , con lo que se logra una gran inter-fase aire-sangre que asegura un eficaz y rápido intercambio gaseoso.

Aunque las técnicas de oxigenación, tanto por burbujas como por laminación permiten perfusiones de varias horas, la continua agresión sobre los elementos sanguíneos (eritrocitos, plaquetas, proteínas, lipoproteínas, etc.), tienden a limitar su empleo. Junto con los problemas de coagulación y hemólisis, el empleo de antiespumantes, las variaciones de los niveles sanguíneos y los accidentes trombóticos y hemorrágicos operatorios que acompañan a la utilización de estos sistemas, han llevado desde 1955 al desarrollo final de los oxigenadores de membranas.

El empleo de una fina membrana destinada a separar el compartimento sanguíneo del gaseoso, pero permitiendo además una rápida difusión y la instauración de un sistema cerrado que se oponga al necesario gradiente de presión, parece solventar satisfactoriamente la mayoría de los problemas asociados con cualquier otro tipo de técnica apta para la oxigenación.

Las ventajas de todos los oxigenadores de membrana radican en la disminución del trauma sanguíneo a la vez que nos permitan una completa y eficaz manera de regular de forma



sencilla el volumen sanguíneo, eliminándose el empleo de antiespumantes y disminuyendo al máximo los problemas de coagulación y hemorragia. El principal problema estriba en el desarrollo de membranas adecuadas siendo el teflón y el silastic las que parecen ofrecer las máximas ventajas para su construcción.

Clorrer (1955), Melrose (1959), Peirce (1960) y Galleti (1963) aparecen como los pioneros en este campo. En los últimos años aparece una nueva generación de oxigenadores de membranas con tipos totalmente homologados y que sin duda cumplen todos los requisitos para permitir una alta transferencia gaseosa durante períodos prolongados de tiempo, con mínimo volumen de cebamiento y a la vez que con también un mínimo trauma sanguíneo.

Como conclusión para utilizar sistemas de perfusión de órganos aislados, nos queda indicar que no existe un acuerdo unánime sobre que parámetros deben de ser controlados y regulados. La tendencia actual incluye: bases empíricas (peso, superficie y temperatura de perfusión) bases hemodinámicas (regulación de presión y el flujo de perfusión) y bases químicas (tensión de  $O_2$  y  $CO_2$ , consumos de diferentes metabolitos o producción de los mismos), así como el control de los diferentes parámetros que especifican cada función orgánica en particular.

En resumen podemos admitir las siguientes convicciones de criterios que justifican una adecuada perfusión:

- I - Función orgánica: Rendimiento específico del tejido perfundido.
- II - Consideraciones metabólicas: Utilización de  $O_2$  y la producción de lactato.
- III - Factores hemodinámicos: Resistencia vascular, observaciones de la microcirculación, distribución del flujo sanguíneo y desarrollo de edema.
- IV - Estudios anatómicos: Aspecto morfológico, microscopía y ultraestructura.
- V - Existencia de destrucción celular: enzimas lisosómicos y liberación de material vasoactivo.

266

HIPOTESIS

La anterior revisión, esencial a nuestro entender, ha intentado exponer las dificultades y posibles soluciones dirigidas a mantener unas condiciones normales o fisiológicamente ideales en los distintos órganos sometidos teóricamente a perfusión. Es evidente no solo la complejidad de los medios auxiliares necesarios, sino también la desfavorable repercusión de éstos sobre una completa fisiología morfofuncional de un teórico órgano o sistema en experimentación. En un intento de obviar las anteriores dificultades hemos recogido los trabajos que intentan o que de hecho han logrado sustituir los sistemas mecánicos anteriormente descritos por el complejo cardio-pulmonar del propio animal en experimentación, basados en la clásica y primitiva preparación cardio-pulmonar de Starling, aunque en realidad la actualidad bibliográfica recogida sobre el presente tema es prácticamente inesistente y adolece de falta de continuidad.

El presente trabajo ha sido planteado frente a la posibilidad de verificar observaciones fisiológicas y experimentales sobre unos modelos que debemos homologar y frente a los que opondremos las condiciones necesarias para estudiar un comportamiento fisiológico que hagan válido el modelo diseñado.

Por otro lado estos sistemas ofrecen obvias ventajas respecto a estudios "in vitro" muy precisos bajo condiciones totalmente controladas. La autoperfusión creemos que soluciona plenamente todos los problemas anteriormente enumerados. El estudio comparativo entre la perfusión mecánica standard y la autoperfusión es el objetivo fundamental de este trabajo, con la comprobación sobre los criterios anteriormente expuestos de una función orgánica normal, con una adecuada depuración de la sangre, con un mantenimiento de una

PCO<sub>2</sub> normal, como, en el caso del hígado una normal producción de bilis o el control homeostático del binomio-glucosa-glucógeno, una producción normal de orina y unos controles básicos de las preparaciones, o con respecto a la evaluación morfológica de los tejidos perfundidos infiriéndose su normalidad en dos niveles de control, estructura tisular y estructura celular objetivables mediante técnicas de microscopía óptica o ultra microscopía del componente celular.

El logro de estos objetivos hará posible con unos medios materiales muy reducidos una serie de trabajos experimentales con perspectivas ilimitadas frente a una nueva tecnología (que ha surgido con la promoción de materiales muy específicos, oxigenadores, bombas, catéteres antitrombogénicos de baja resistencia, servo-sistemas de control. Problemas de interfase líquido-gas, líquido-superficie de contacto, esterilización, monitorización controlada, etc.) compleja de difícil manejo y elevado coste.

## PLANTEAMIENTO

Diseño. El planteamiento de las primeras posibilidades indicadas, obligará a la realización de un circuito capaz de aprovechar tanto los pulmones como el corazón del propio animal, de tal manera que mediante determinadas derivaciones, el sistema pulmón-corazón sirva para perfundir directamente el órgano elegido.

Realización. La posibilidad anteriormente mencionada aparece ampliamente recogida en una preparación cardiopulmonar autoperfundida, a la que en determinadas ocasiones cuando lo consideremos oportunos podrán acoplarse otros órganos.

La utilización de circuitos extracorpóreos o asistidos, ofrecerá múltiples planteamientos, aunque en nuestro caso concreto hemos usado de ellos exclusivamente para la obtención de datos meramente comparativos con los obtenidos en los sistemas de autoperfusión.

Autoperfusión "in situ". Este sistema de perfusión está basado en la autosuficiencia del sistema cardiopulmonar para lograr una correcta funcionalidad hemodinámica y respiratoria. La descripción tanto de este método como de los otros empleados se hará en la metodología que posteriormente desarrollaremos.

Autoperfusión "aislada". Poco difiere este sistema de autoperfusión del anteriormente descrito, su diferencia estriba exclusivamente en la extracción y aislamiento de las vísceras y sistemas en estudio con total independencia del resto de las estructuras anatómicas del animal en experimentación. La perfusión es igual que en el caso anterior autosuficiente.

Perfusión "mecánica" ó "asistida". Este sistema necesita obligadamente del empleo tanto de bombas de perfusión como de oxigenador. Su funcionalismo puede ser exclusivamente mecánico o bien como ayuda prestada a una bomba cardíaca que desfallece, en este caso hablaremos de perfusión mecánica "asistida".

La realización de la hipótesis de trabajo expuesta, exigirá un planteamiento completo. En síntesis la sistemática que hemos considerado más apropiada comprende:

1º- Obtención del modelo anatómico

- Elección de la especie animal adecuada
- Diseño
- Realización

2º- Descripción de los sistemas de perfusión empleados

- Autoperfusión "in situ"
- Autoperfusión "aislada"
- Perfusión "mecánica" ó "asistida"

3º- Líquido de perfusión

4º- Controles de la preparación

- Hemodinámicos
- Bioquímicos

5º- Estudio de los órganos sometidos a experimentación

- Fisiologismo
- Estructura

6º- Líneas de investigación en base al logro de un modelo anatómico correcto.

Elección de la especie animal adecuada. Dado que los sistemas de perfusión elegidos son: pulmón-corazón, hígado y riñón, la especie animal elegida, en base fundamentalmente del tamaño y de su facilidad de adquisición ha sido el perro.



Líquido de perfusión. En la realización de nuestra hipótesis de trabajo el líquido de perfusión será invariablemente la sangre del propio animal, diluida y con la obligada adición de determinadas sustancias imprescindibles para mantener unas condiciones metabólicas óptimas.

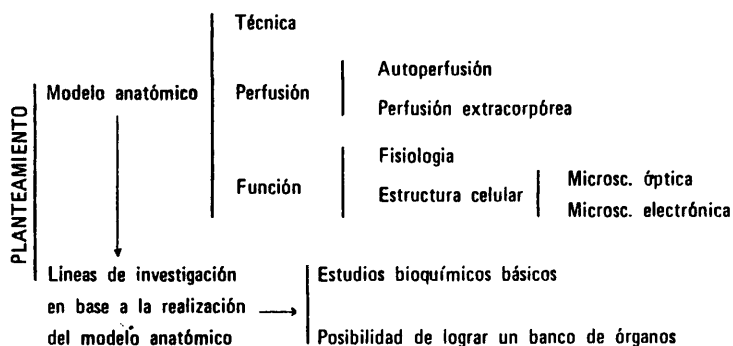
Control de la preparación. Hay una serie de parámetros que obligatoriamente debemos mantener en todas nuestras experiencias, bien de tipo hemodinámicos (temperatura, presión de la línea arterial, presión en ambas aurículas y en la arteria pulmonar); o bien controles bioquímicos (urea, glucosa, K, Na, V.Hematocrito, pH,  $PCO_2$ ,  $PO_2$ , etc.) y cuya desviación del rango de la normalidad, será expresión de la validez del modelo empleado.

Estudio de los órganos sometidos a experimentación. Paso obligado en el presente planteamiento, será la verificación lo más objetivamente posible de la fisiología y de la estructura del órgano en cuestión. El control de un normal fisiologismo del órgano (oxigenación, flujo biliar, formación de orina, etc.) y de una comprobación morfológica tanto macro y ultra estructural serán expresión de los requerimientos anteriormente exigidos.

Líneas de investigación en base al logro de un modelo anatómico correcto. Una vez cumplidos los requisitos mencionados anteriormente, estaremos en condiciones de plantearnos su realización. El estudio de los aspectos bioquímicos básicos de los diferentes parénquimas nos puede obligar al empleo de ciertas sustancias marcadas que nos permitan el estudio secuencial de una determinada vía metabólica, que superadas las normas expuestas de homologación nos pueda dar entrada a una vía de experimentación pura o bien en último caso incluso nos sirva de base para la realización de un banco de órganos viables.

La obtención de un tiempo máximo de supervivencia, el empleo de hipotermia o la obtención de un líquido ideal de perfusión, constituirían unas líneas de investigación a considerar, del máximo interés y que justificarían un estudio más completo de los modelos ya obtenidos.

### RESUMEN



MATERIAL Y METODO

### MATERIAL

- Animales empleados
- Material quirúrgico
- Tubos, conexiones y reservorios
- Bombas y oxigenadores
- Líquido de perfusión
- Aditivos

1. Animales empleados. Hemos efectuado diferentes intervenciones sobre un total de 92 animales, perros de diferente edad, peso y sexo, siempre en medio aséptico y con normotermia, siendo nuestras experiencias las que aparecen en la TABLA I.

2. Material quirúrgico. El material empleado es similar al que se utiliza en intervenciones quirúrgicas sobre humanos, con las características específicas de la preparación que vayamos a realizar y junto al arsenal standard que para cualquier tipo de intervención de cirugía mayor sean necesarios. Es importante saber elegir y en su caso proveer, el material adecuado que en cada momento podamos necesitar.

3. Tubos, conexiones y reservorios. En aquellas preparaciones, en que el sistema de bombeo y oxigenación corra a cargo del propio sistema cardiorrespiratorio del animal, el material accesorio se reducirá a los mínimos elementos necesarios para formar un circuito extracorpóreo, a saber: tubos de conexión que garanticen una línea de salida desde el sistema arterial del animal, un reservorio provisto de un sistema de atrapamiento de burbujas que recoja la sangre eyectada por la aorta y canalizada por la línea anteriormente dicha y finalmente un sistema de retorno que asegure la vuelta del líquido de perfusión desde el reservorio a las cavidades derechas del corazón. En el caso de este circuito extracorpóreo simple, cuyo ejemplo en nuestras experiencias es la preparación cardiopulmonar autoperfundida, la longitud y la luz de

Nº Exp.	Fecha	Sexo	Edad	Peso
01	21-VI-72	♀	8 m.	22 K.
02	28-VI-72	♂	3 a.	30 K.
03	11-VII-72	♂	2 a.	28 K.
04	18-VII-72	♂	1,5 a.	27 K.
05	28-VII-72	♂	3,5 a.	34 K.
06	9-X-72	♀	2 a.	26 K.
07	16-X-72	♂	1 a.	25 K.
08	6-XI-72	♀	1,5 a.	27 K.
09	13-XI-72	♀	2 a.	25 K.
10	13-XI-72	♀	2 a.	20 K.
11	27-XI-72	♂	2 a.	21 K.
12	4-XII-72	♂	5 a.	29 K.
13	11-XII-72	♀	1,5 a.	27 K.
14	18-XII-72	♂	2 a.	30 K.
15	29-XII-72	♀	2 a.	21 K.
16	29-XII-72	♂	2 a.	30 K.
17	8-I-73	♂	3 a.	25 K.
18	22-I-73	♂	4 a.	30 K.

19	29-I-73	♂	3 a.	31 K.
20	5-II-73	♂	2 a.	29 K.
21	12-II-73	♂	4 a.	32 K.
22	26-II-73	♂	2 a.	27 K.
23	5-III-73	♂	5 a.	26 K.
24	9-III-73	♂	2 a.	28 K.
25	12-III-73	♂	5 a.	33 K.
26	20-III-73	♂	4 a.	30 K.
27	25-III-73	♂	5 a.	35 K.
28	7-IV-73	♂	5 a.	28 K.
29	20-IV-73	♂	5 a.	30,5 K.
30	8-V-73	♂	5 a.	32 K.
31	20-V-73	♂	3 a.	28 K.
32	26-V-73	♂	4 a.	30,5 K.
33	4-VI-73	♂	4 a.	29 K.
34	13-VI-73	♂	3 a.	33 K.
35	1-VII-73	♀	2,5 a.	20 K.

36	16-VII-73	♀	2 a.	22 K.
37	28-IX-73	♀	2,5 a.	24 K.
38	3-X-73	♀	2 a.	19 K.
39	20-X-73	♂	4 a.	30,5 K.
40	24-X-73	♂	4,5 a.	31 K.
41	25-X-73	♂	4 a.	35 K.
42	2-XI-73	♂	3,5 a.	32 K.
43	6-XI-73	♂	5 a.	31,5 K.
44	25-XI-73	♂	4,4 a.	28 K.
45	12-XI-73	♂	2 a.	29,5 K.
46	18-I-74	♂	4 a.	27 K.
47	28-I-74	♂	3,5 a.	34 K.
48	10-II-74	♂	4 a.	32,5 K.
49	18-II-74	♂	2,5 a.	30 K.
50	5-III-74	♂	3 a.	25 K.
51	18-III-74	♂	3 a.	34,5 K.
52	27-III-74	♂	4 a.	21,5 K.

53	5-IV-74	♀	2,5 a.	26 K.
54	6-IV-74	♀	3 a.	27 K.
55	22-IV-74	♂	2,5 a.	28 K.
56	15-V-74	♂	2 a.	18 K.
57	10-VI-74	♂	4 a.	30 K.
58	25-VI-74	♂	4,5 a.	30,5 K.
59	2-VII-74	♂	3,5 a.	32 K.
60	4-VII-74	♂	4 a.	27 K.
61	10-X-74	♂	3 a.	30 K.
62	23-X-74	♂	3 a.	26 K.
63	1-XI-74	♂	4,5 a.	31 K.
64	13-XI-74	♂	2,5 a.	34 K.
65	26-XI-74	♂	4 a.	34,5 K.
66	3-XII-74	♂	2,5 a.	32 K.
67	26-XII-74	♂	3 a.	35 K.
68	12-I-75	♂	3 a.	36 K.
69	30-I-75	♂	4 a.	35,5 K.



70	6-II-75	♂	3,5 a.	36 K.
71	7-III-75	♂	3,5 a.	30 K.
72	10-III-75	♂	4 a.	32 K.
73	28-III-75	♂	2,5 a.	30 K.
74	7-IV-75	♀	2 a.	28 K.
75	21-IV-75	♀	2 a.	30 K.
76	10-V-75	♀	2,5 a.	30,5 K.
77	2-VI-75	♂	3,5 a.	33 K.
78	3-VII-75	♂	3 a.	18 K.
79	10-X-75	♂	3 a.	36 K.
80	30-X-75	♂	4 a.	31 K.
81	4-XI-75	♂	2 a.	31 K.
82	17-XI-75	♂	3 a.	32 K.
83	30-XI-75	♂	2,5 a.	29,5 K.
84	10-XII-75	♂	3 a.	26 K.
85	29-XII-75	♂	3 a.	21 K.
86	15-I-76	♂	2 a.	27 K.

87	2-II-76	♂	3 a.	31 K.
88	8-III-76	♂	3 a.	30 K.
89	4-IV-76	♀	2,5 a.	25 K.
90	16-IV-76	♂	1,5 a.	22 K.
91	20-V-76	♂	3 a.	31 K.
92	15-XII-76	♂	2 a.	28 K.
Nº Exp.	Fecha	Sexo	Edad	Peso

la línea de salida, junto con la altura a la que se sitúa el reservorio, forman el equivalente a la resistencia vascular periférica.

En este sistema, el "cebamiento", queda limitado a la replección de la línea de retorno, con el fin de evitar una posible embolia gaseosa y de mantener un mínimo nivel de reserva que en total puede representar no más de 200 ml. de líquido. En nuestros casos éste "cebamiento" se lleva a cabo con solución salina fisiológica. No es necesario el sangrado previo del animal, pues la sangre de éste que garantizará el volumen de perfusión, se recoge durante la propia técnica de realización tal y como quedará posteriormente expuesto al describir el montaje específico de la preparación cardio-pulmonar.

Las conexiones empleadas por nosotros han sido del tipo "Argyle" AR. 1.116, los reservorios son del tipo "Steriflex" con una malla de acero inoxidable en su interior que actúa de filtro. La totalidad de las conexiones han sido de acero inoxidable o de plástico, tanto de perfil lineal, como de perfil "Y" ó "T".

En este tipo de sistemas el mantenimiento de una temperatura constante lo hemos logrado mediante el baño de una determinada porción de la línea tanto de entrada como de salida en agua caliente, controlándose dicha temperatura a nivel de la salida del reservorio y a la entrada del mismo en una cifra constante de 37,5 á 38°centígrados.

4. Bombas y oxigenadores. En aquellas preparaciones en las que están previstas perfusiones mecánicas extracorpóreas, habrá que tener preparado de antemano el montaje de dicho circuito, junto a las líneas, conexiones y reservorios antes

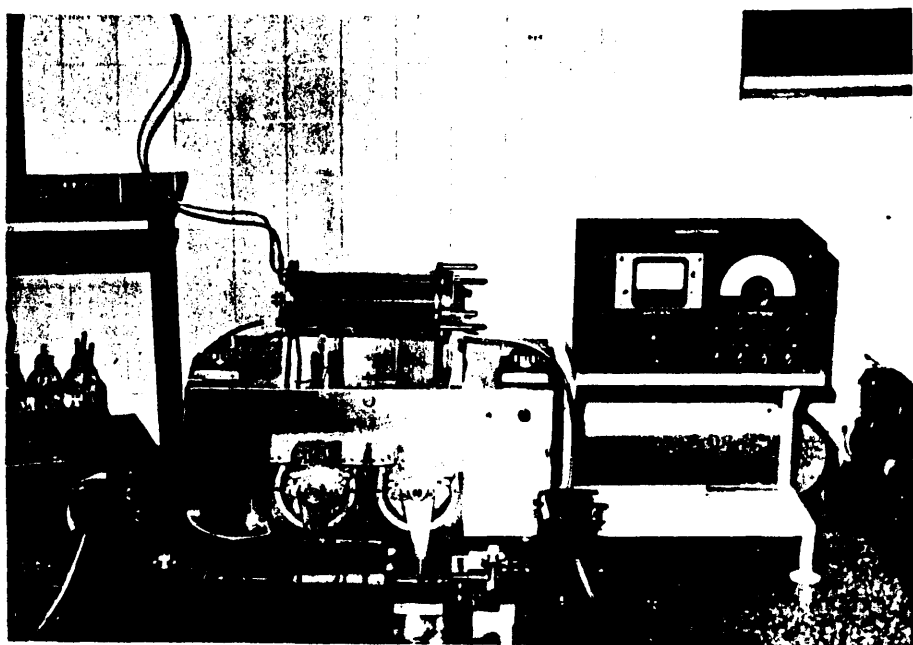


Fig. 1 Panorámica general de los aparatos de asistencia cardio-pulmonar utilizados. Bombas tipo SIGMA-MOTORS y KAY-CROSS. Oxigenador de disco KAY-CROSS, compacto para el control de las revoluciones de los discos en el oxigenador, así como para el mantenimiento de la temperatura de perfusión.

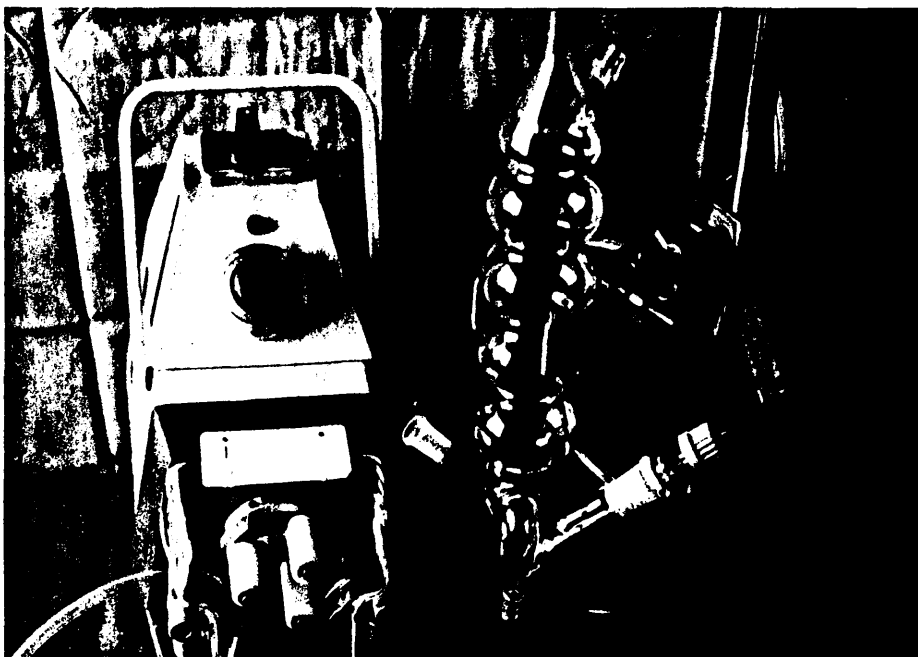


Fig. 2 Panorámica de oxigenador de vidrio según diseño AFORA, con termómetro incorporado y bomba de perfusión peristáltica "Watson, Marlow" modelo MARE 200.

indicados es imprescindible la preparación de oxigenadores y bombas adecuadas. El sistema extracorpóreo, quedará constituido fundamentalmente por el oxigenador y la bomba, el reservorio, los filtros, el intercambiador de temperatura y las conexiones. En nuestra experiencia el oxigenador ha sido del tipo de discos rotatorios, modelo Kay-Cross, ventilado con mezcla de oxígeno y anhídrido carbónico en la proporción 95/5, o bien oxigenador de vidrio según diseño Afora empleando la misma mezcla. Las bombas utilizadas indistintamente han sido una "Sigma-Motors", una "Kay-Cross" y en los últimos tiempos una "Watson-Marlow", modelo -MRE 200- peristáltica con gama de flujos que oscila entre 800 y 35 ml. por minuto. El intercambiador de temperaturas fue igualmente un montaje compacto "Kay-Cross", con el que se controlan tanto la velocidad rotacional de los discos del oxigenador, como el flujo proporcionado por la bomba. Todos estos elementos aparecen recogidos en las Figs 1 y 2.

En el caso del empleo de éste circuito extracorpóreo complejo, las necesidades de cebamiento aumentan y es necesario o bien el empleo de hemodilución o la exanguinación de un segundo animal, aunque en el caso de perfusión de órganos únicos, dado que los circuitos son muy reducidos, estos requerimientos de "cebado", son mínimos, siendo factibles la utilización de la sangre del propio animal bajo experimentación.

5. Líquidos de perfusión. Tal como hemos adelantado en los dos apartados anteriores, las necesidades del cebamiento, de los circuitos, simplificados o totales, nos obligan a emplear distintas soluciones, de cuya elección se derivarán problemas relacionados con la hemodilución o con la mezcla de sangres homólogas. Parece ser que la totalidad de los objetivos perseguidos con este tipo de preparaciones pueden

lograrse mediante la hemodilución, que aparece de esta forma no ya como el sistema ideal si al menos como el óptimo entre los métodos disponibles. Tanto soluciones cristaloideas (salinas fisiológicas, glucosadas isotónicas, Ringer lactadas, etc.) como las soluciones coloidales (dextranos, gelatinas, etc.) son útiles para el desarrollo de esta técnica. De cualquier forma el líquido de perfusión ideal ha de presentar una alta capacidad de transporte de  $O_2$ , así como de una adecuada presión coloidal y osmótica, debiéndose de tener en cuenta, que cuando se emplean circuitos extracorpóreos, la resistencia al flujo en el sistema de conducción, es proporcional a la viscosidad y que ésta depende fundamentalmente del valor hematocrito de la solución. Parece ser que un hematocrito aproximadamente del 30% sería el considerado como el ideal para dichas circunstancias.

En nuestra experiencia, cuando se han utilizado sistemas extracorpóreos simples, el cebamiento inicial se efectuó siempre con dextranos, manteniéndose posteriormente el nivel del reservorio con adiciones progresivas de soluciones salinas. En el caso de la utilización de circuitos extracorpóreos completos, el cebamiento del oxigenador se ha verificado con dextrano. Manteniéndose el nivel del reservorio mediante adiciones sucesivas de sangre total.

Los flujos de perfusión han oscilado entre 100 ml./min. por Kg. de peso (en el caso de perfusiones pulmonares) a 500 ml./min. en perfusiones esplánicas, estimándose el flujo de sangre en el estómago de 35 a 40 ml./min. y en el páncreas de 25 a 30 ml./min. por 100 gr. de peso, lo que significa que los requerimientos de flujo en un órgano bajo perfusión, son prácticamente iguales a los estimados "in vivo". La presión de perfusión media osciló entre los 60 y 80 mm. Hg. comprobándose que en casos de sobreperfusión, aún en períodos muy limitados de tiempo se provocan cambios rápidamente evi -

denciables y que deben controlarse de inmediato si no se quiere que ocurran cambios irreversibles. En casos de perfusiones controladas, en los que de manera brusca aumenta la presión de perfusión, deberá sospecharse rápidamente de una posible obstrucción mecánica.

Otra de las maneras de controlar la cuantía de la perfusión es mediante la determinación de la saturación de  $O_2$  venoso, siendo un valor superior al 80% sugestivo de un exceso de flujo para las necesidades metabólicas del órgano.

6. Aditivos. Dentro de éste apartado hemos de considerar dos grupos bien definidos de sustancias introducidas en el circuito de perfusión.

Consideramos factores aditivos generales, aquellos que se introducen en el circuito con la finalidad exclusiva de asegurar un normal funcionamiento, dentro de este grupo debemos de referirnos por un lado a sustancias nutritivas y por otro a sustancias consideradas como "drogas". Los factores de carácter nutritivo serán todos aquellos que aparezcan implicados en el aporte energético correcto de la víscera en estudio y que básicamente estarán representados por la glucosa y la insulina. En todos los estudios se ha considerado como sustrato fisiológico a la dextrosa, con el fin de que al iniciar los diferentes estudios metabólicos no existan interferencias de metabolitos no fisiológicos basalmente. En todos los casos se administraron fraccionada y repetidamente pequeñas dosis de insulina (2-4 U./60'). Debemos hacer la salvedad de que en determinados estudios bioquímicos, en los que estaba implicada la biosíntesis de lípidos, se han mantenido concentraciones ligeramente suprafisiológicas de glucosa, con la única finalidad de favorecer la biosíntesis de los ácidos grasos.



Dentro del subgrupo de sustancias nutritivas y aunque no directamente implicadas en el aporte energético, hemos de considerar la adición correcta de electrolitos, adición en ningún caso implicada con las soluciones ya referidas y que se emplearon en el cebamiento del sistema, pero que hubieron de aportarse ocasionalmente con el fin de mantener una estabilidad en el volumen de la perfusión. Los iones marcados fueron:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^+$  y  $\text{CO}_3\text{H}^-$ , siendo de destacar la dificultad para mantener un pH estable, por la tendencia en unos casos de la preparación hacia la acidosis metabólica y en otros por la dificultad de mantener una eliminación equitativa de  $\text{CO}_2$ , pese a utilizar carbógeno para su eliminación.

Con respecto a las "drogas" debemos hacer dos consideraciones, por una parte la correspondiente a aquellos agentes farmacológicos introducidos con la finalidad de mantener una óptima función del órgano en estudio (digitálicos, drogas ionotrópicas o diuréticos como el furosemide). Por otro consideramos igualmente drogas aquellas sustancias introducidas como "marcadores" para el estudio de los aspectos bioquímicos del órgano. En nuestro caso el enfoque se ha dirigido fundamentalmente hacia el estudio de las diferentes vías biosintéticas de fosfolípidos estructurales, empleando indefec - tiblemente sustancias precursoras marcadas de dichas vías metabólicas: acetato marcado con tritio, ácido palmítico marcado con carbono 14 ( $\text{C}^{14}$ ) y fósforo 32 ( $\text{P}^{32}$ ).

Tabla II.

METODOLOGIA

- Diseño del modelo anatómico
- Anestesia y preparación del campo
- Realización técnica de la preparación
  - Cardiopulmonar autoperfundida "in situ"
  - " " "aislada"
  - " " "mecánica o asistida"
  - Hepática autoperfundida "in situ"
  - " " "aislada"
  - " " "mecánica o asistida"
  - Renal autoperfundida "in situ"
  - " " "mecánica o asistida"
  - Hepato-renal autoperfundida "in situ"
- Controles de la perfusión
  - Flujo aportado
  - Recambio gaseoso
  - Intercambio capilar
  - Temperatura
- Estudio de la función
- Estudio estructural
  - Microscopía óptica
  - Microscopía electrónica

Diseño del modelo anatómico.

Con respecto a las características generales, la técnica habitual puede agruparse en dos variantes, por un lado aquellas vísceras que presentan pedículos vasculares lo suficientemente importante como para permitir una fácil aplicación a los sistemas de conexión y por otro, aquellos órganos con pedículos de difícil manejo que obligan a maniobras o preparaciones complejas para poder ser utilizados. En el primer caso el proceder quirúrgico irá destinado a aislar el órgano elegido con sus estructuras vasculares completamente aislado. En el segundo caso la disección vascular seguirá los troncos arteriales y venosos hasta su origen o desembocadura en un vaso principal de tal manera que las conexiones vasculares se realizarán a través de dichos troncos principales. Junto con la problemática vascular, debemos de plantearnos la consideración técnica sobre la absoluta prevención de torsiones o compresión en los elementos de aporte o drenaje sanguíneo, con el fin de evitar una repercusión adversa en los resultados finales, tanto de carácter hipóxico como congestivo.

Puede colegirse por tanto que el máximo cuidado y meticulosidad debe de centrarse en el sistema vascular para una correcta obtención de preparaciones viscerales aisladas, asegurando en primer lugar los calibres adecuados para las conexiones y por otra parte una vez efectuadas éstas evitar cualquier tipo de obstáculo tanto a la entrada como a la salida del flujo sanguíneo. Debe añadirse que en aquellas preparaciones en las que se utilice el corazón autólogo como sistema de bombeo, el punto crítico del desarrollo de la técnica, será la derivación de la circulación sistémica al circuito planificado.

Otra de las consideraciones generales en el desarrollo de éstas técnicas, es la aplicación de los sistemas mecánicos de bombeo y oxigenación. El bombeo mecánico podrá emplearse como sistema auxiliar para prevenir el fracaso total de una preparación cuya perfusión se ha confiado en principio al corazón autólogo, o bien como sistema de bombeo primitivo. En el primer caso, en el que el sistema de bombeo representa un dispositivo de emergencia, estará dispuesto en paralelo con el circuito primitivo de la preparación, previamente cebado y en disposición ser inmediatamente conectado cuando el corazón fracase en su función de aportar un gasto efectivo. En el caso de que el bombeo mecánico sea utilizado desde un principio, este deberá de conectarse con el sistema de oxigenación, representado bien por el pulmón autólogo o bien por un sistema de oxigenación artificial. En ambos casos la composición del circuito será similar, es decir, la sangre de retorno será impulsada mediante una bomba auxiliar a los pulmones y una vez oxigenada por éstos será enviada de nuevo por otra bomba hasta el órgano perfundido. En la preparación del pulmón como oxigenador biológico deberá de tenerse en cuenta la capacidad sanguínea de éste, habiéndose comprobado que basta con la utilización de solamente dos o tres lóbulos de un pulmón para obtener una buena irrigación de una víscera aislada.

La otra posibilidad de mantener un circuito de perfusión con pulmón autólogo, es utilizar una preparación pulmonar de la que se deriva una determinada cantidad de gasto hacia la víscera en estudio. En este caso, aunque la perfusión orgánica se hará con sangre mezclada, los niveles de concentración de  $O_2$  serán más que suficientes, pues la mezcla que representa la sangre de drenado visceral es muy pequeña en comparación con el volumen en reciclamiento hiperoxigenada por los pulmones.

Como hecho general queda establecido que la incorporación de una víscera al sistema original cardio-pulmonar se efectuará invariablemente en la línea de salida arterial cardíaca, yendo a parar la sangre de retorno procedente del órgano al reservorio general del circuito.

El drenaje venoso de los órganos perfundidos a excepción de la preparación cardio-pulmonar, o cuando se emplea un pulmón autólogo como oxigenador, se recoge por simple gravedad a través de la línea de salida en un reservorio (índice directo del gasto de la preparación), la sangre así recogida será trasladada en caso de que se utilice como nodriza la preparación cardio-pulmonar, al reservorio común del circuito. En el caso de que sea una preparación de órgano aislada, la sangre recogida por gravedad pasará directamente al sistema de oxigenación, de éste al sistema de bombeo, siendo el encargado de mantener la continuidad en el reciclamiento.

El problema técnico más difícil, se presenta cuando utilizamos un pulmón autólogo, puesto que en este caso no basta la simple gravedad para impulsar la sangre del retorno venoso a través del pulmón oxigenador. En este caso es necesario verificar conexiones a una bomba accesoría, que por un lado recogerá la sangre de retorno por succión y por otro la impulsará a través del pulmón. A su vez un segundo sistema de bombeo tomará la sangre pulmonar arterializada y la ofrecerá al órgano perfundido.

#### Anestesia y preparación del campo

Todos nuestros animales empleados estuvieron sometidos a dieta absoluta desde 12 horas antes de la intervención.

La anestesia empleada ha sido: Premedicación con atropina, 1,5 mgr. i.v. La inducción con pentotal sódico, 250 a 300 mgrs. i.v. y mioflex 40 mgrs. i.v., manteniéndose la anestesia con Palfium 2 mgrs. i.v. y Haloperidol 4 mgrs. i.v., ambos administrados de forma intermitente.

Lograda la inducción se procede a retirar inmediatamente el vendaje facial, con apertura forzada de las fauces, tracción de la lengua y colocación de un tubo endotraqueal con balón hinchable. Una vez colocado y asegurado dicho tubo, se procede a la ventilación manual que en nuestros casos se realizó con aire ambiente (21% de concentración de  $O_2$ ), manteniéndose un volumen de ventilación similar al ideal calculado a partir de la superficie corporal del perro.

Una vez lograda la anestesia se coloca en decúbito supino, asegurándose la posición mediante el anclaje de los 4 miembros a la mesa de intervenciones, así como la estabilización del tórax y del abdomen mediante un sistema de almohadillaje colocado a lo largo de ambos flancos; finalmente se realiza el rasurado y la preparación del campo operatorio con las medidas habituales de asepsia. Coincidiendo con todo lo dicho anteriormente se prepara el material que consideramos oportuno para la realización de cada técnica en particular.

Realización técnica de la preparación (Descripción de la técnica en cada una de las preparaciones específicas realizadas).

A.- Preparación cardio-pulmonar autoperfundida. Se ha seguido la técnica descrita por Robicstek, autor que presentó en 1959 una modificación (Fig. 3) de la preparación de Starling, en la que la presión de perfusión coronaria era mantenida estable y el volumen sanguíneo autorregulado. La técnica en esquema puede resumirse así:

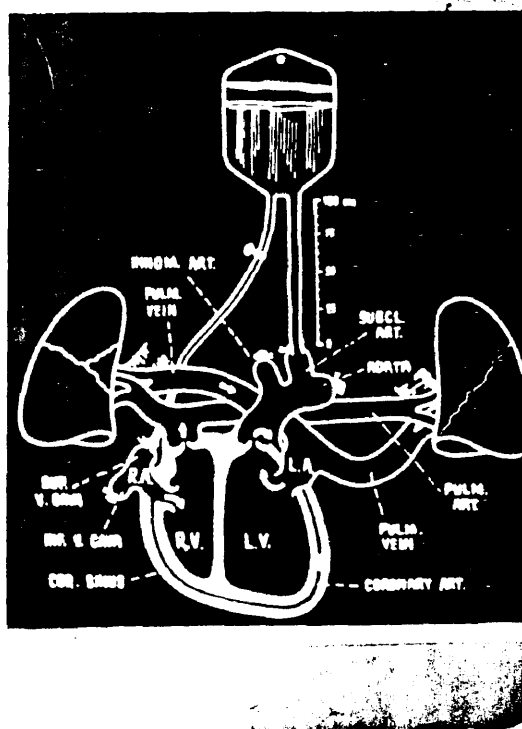
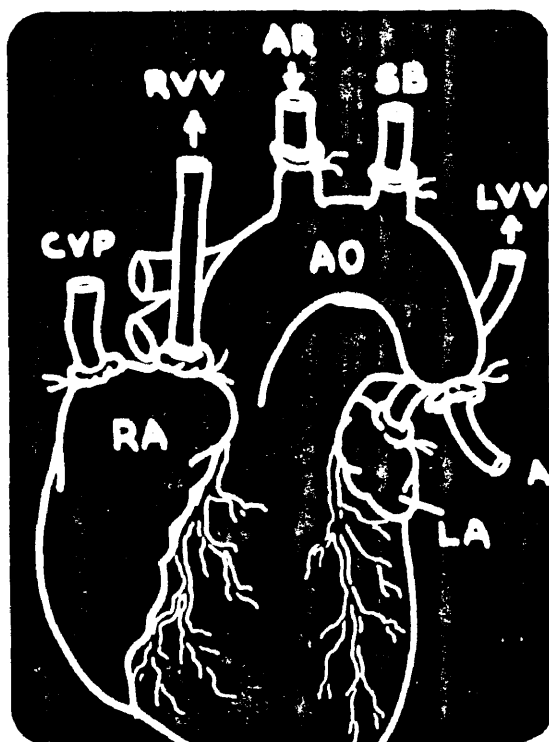


Fig. 3 Esquema del modelo utilizado en la preparación cardiopulmonar, según técnica de ROBICSECK.

Fig. 3 a

- R.A. - aurícula derecha
- R.V. - ventrículo derecho
- L.V. - aurícula izquierda
- R.V. - V. retorno venoso

Fig. 3 b

- A.O. - aorta
- A.P. - presión intra aórtica
- S.B. - A. subclavia
- C.V.P. - presión v. cava superior
- A.R. - innominada (línea de salida).

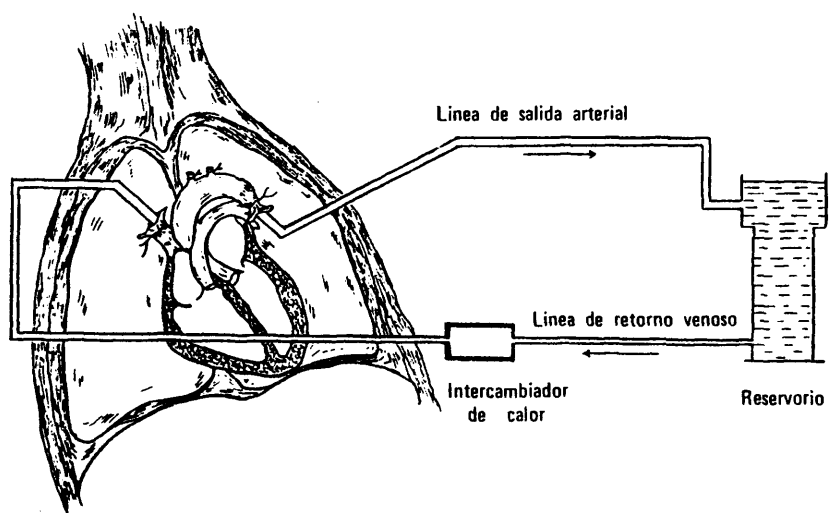


Fig. 4

Diagrama simplificado de la preparación cardio-pulmonar autoperfundida "in situ"



- a) Toracotomía transversa bilateral
- b) Pericardiotomía (Fig. 5)
- c) Disección de la vena ácigos y sección entre dos ligaduras (Figs. 6 y 7)
- d) Disección de la vena cava superior inmediatamente por encima de la desembocadura de la vena ácigos y paso de dos ligaduras (Fig. 8)
- e) Disección de la vena cava inferior inmediatamente distal a su desembocadura en la aurícula derecha.
- f) Disección de la arteria innominada (Figs. 9 y 10).
- g) Disección de la aorta torácica en toda su longitud (Fig. 11).
- h) Previa heparinización, se introduce en la art. subclavia un catéter dirigido proximalmente para registro continuo de la presión en el cayado de la aorta y toma repetida de muestras de sangre.
- i) Introducción en la orejuela derecha de un catéter destinado al registro de la presión venosa central, así como del catéter de retorno procedente del reservorio y que devuelve a la preparación la sangre proyectada por la aorta (Fig. 12).
- j) Ligadura de la arteria innominada.
- k) Introducción en la aorta torácica de la línea de salida que conducirá la sangre bombeada por el corazón hacia el reservorio. Con el fin de evitar la pérdida de sangre por las arterias vertebrales más próximas, se liga la aorta sobre el catéter inmediatamente distal al origen de la subclavia, aun-

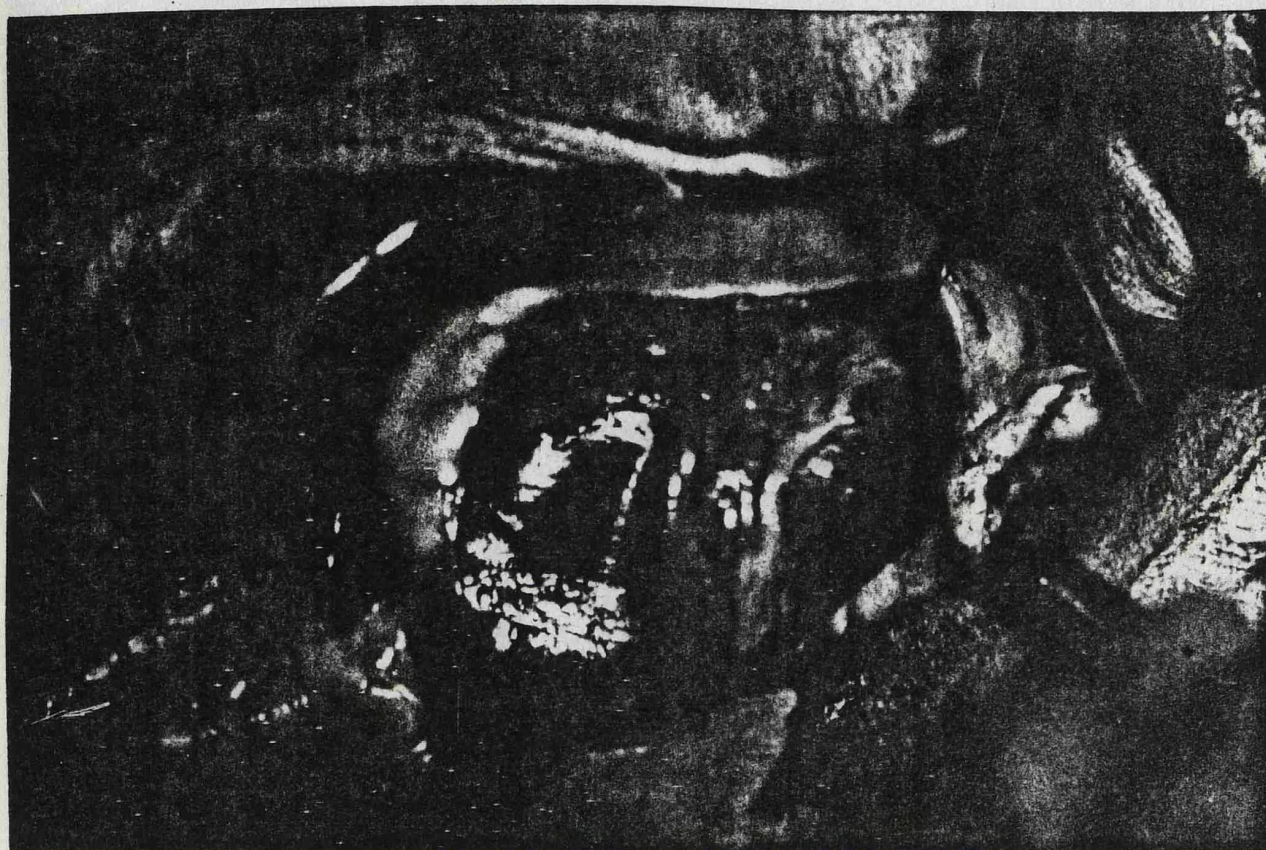


Fig. 5 Preparación cardiopulmonar autoperfundida.  
Pericardiotomía.



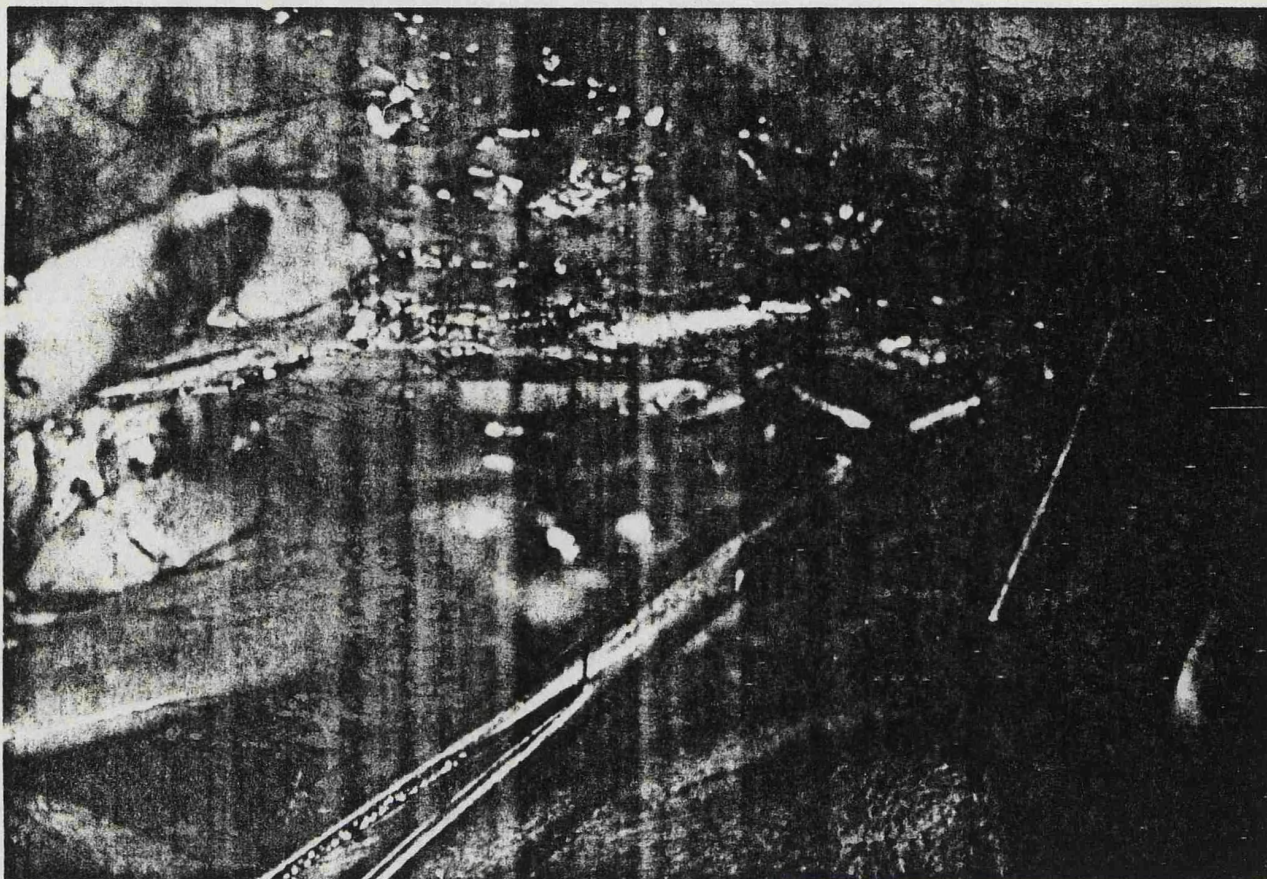


Fig. 6 Preparación cardiopulmonar autoperfundida  
Disección de la vena ácigos.





Fig. 7 Preparación cardiopulmonar autoperfundida.  
Disección y resección de la vena ácigos.



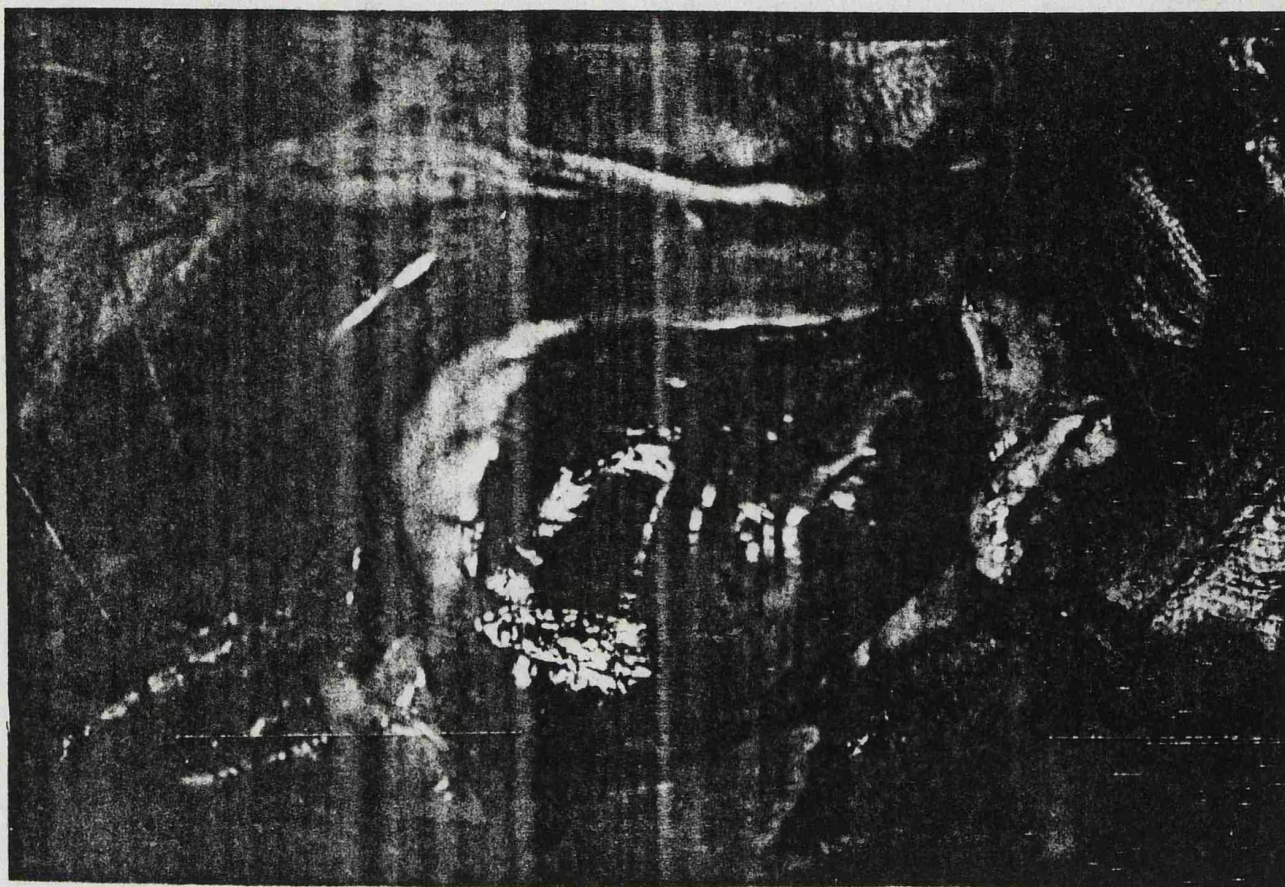


Fig. 8 Preparación cardiopulmonar autoperfundida  
Disección de la vena cava superior.



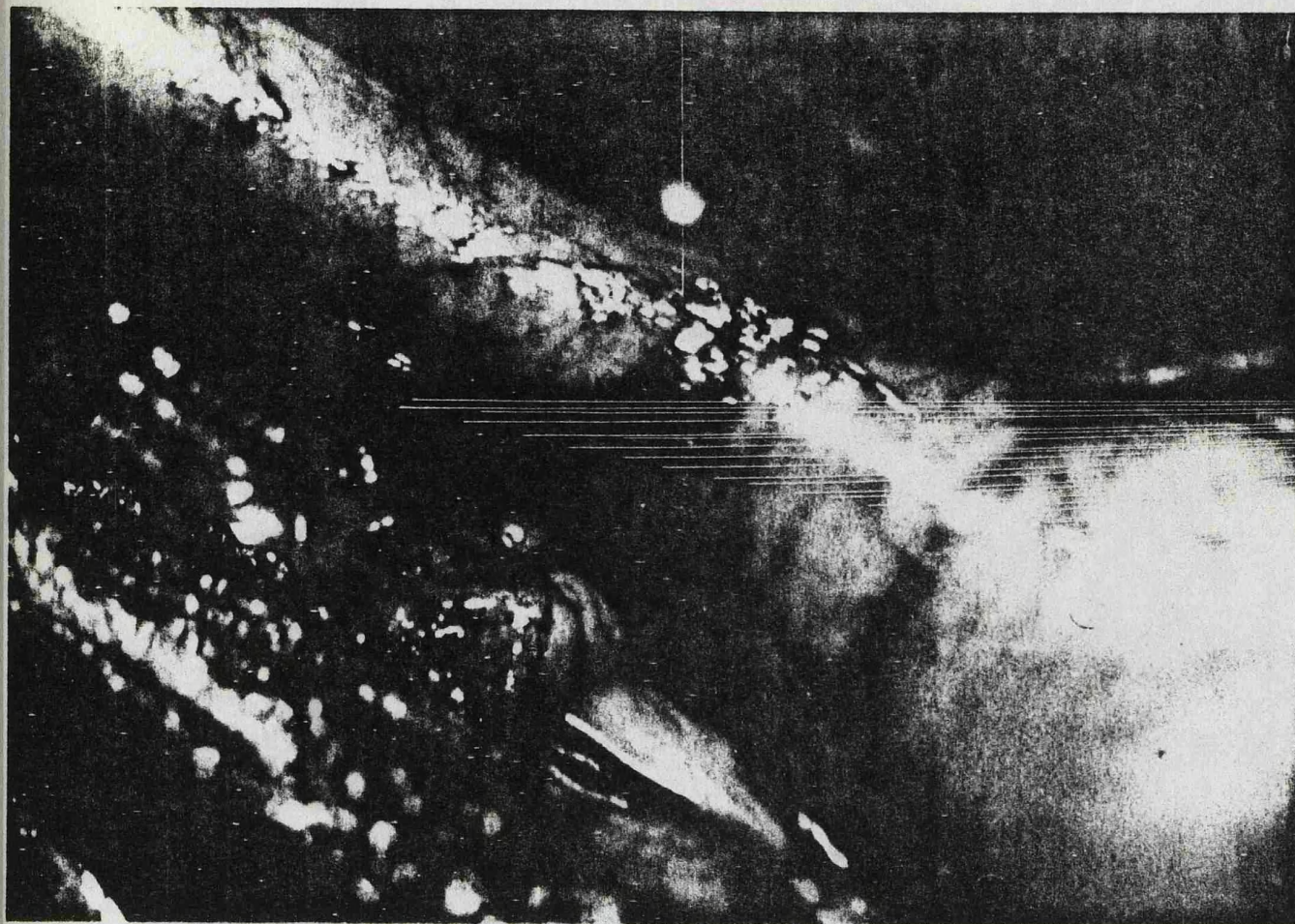


Fig. 9 Preparación cardiopulmonar autoperfundida.  
Disección de la arteria innominada.



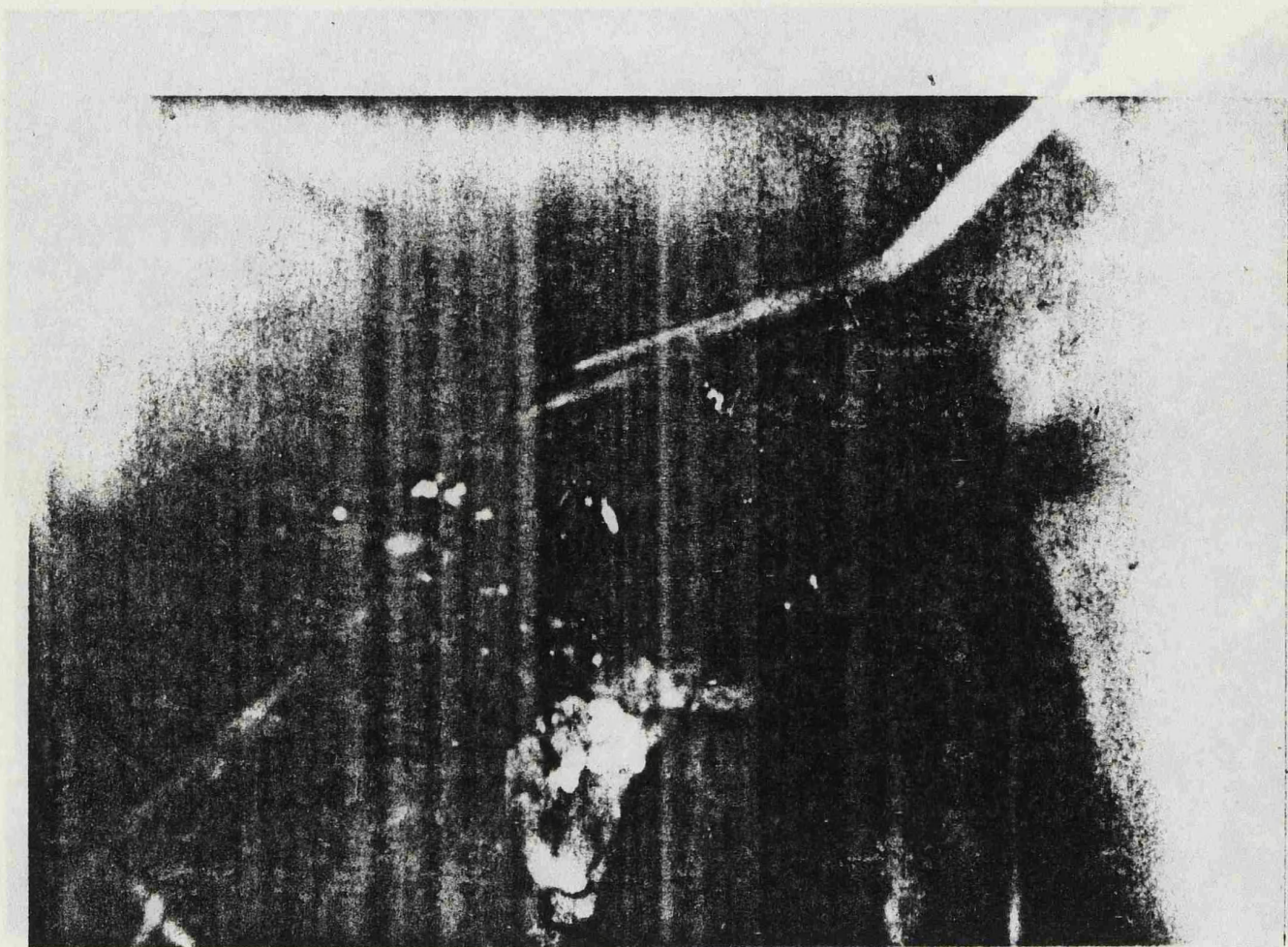


Fig. 10 Preparación cardiopulmonar autoperfundida.  
Disección de los troncos supra-aórticos.



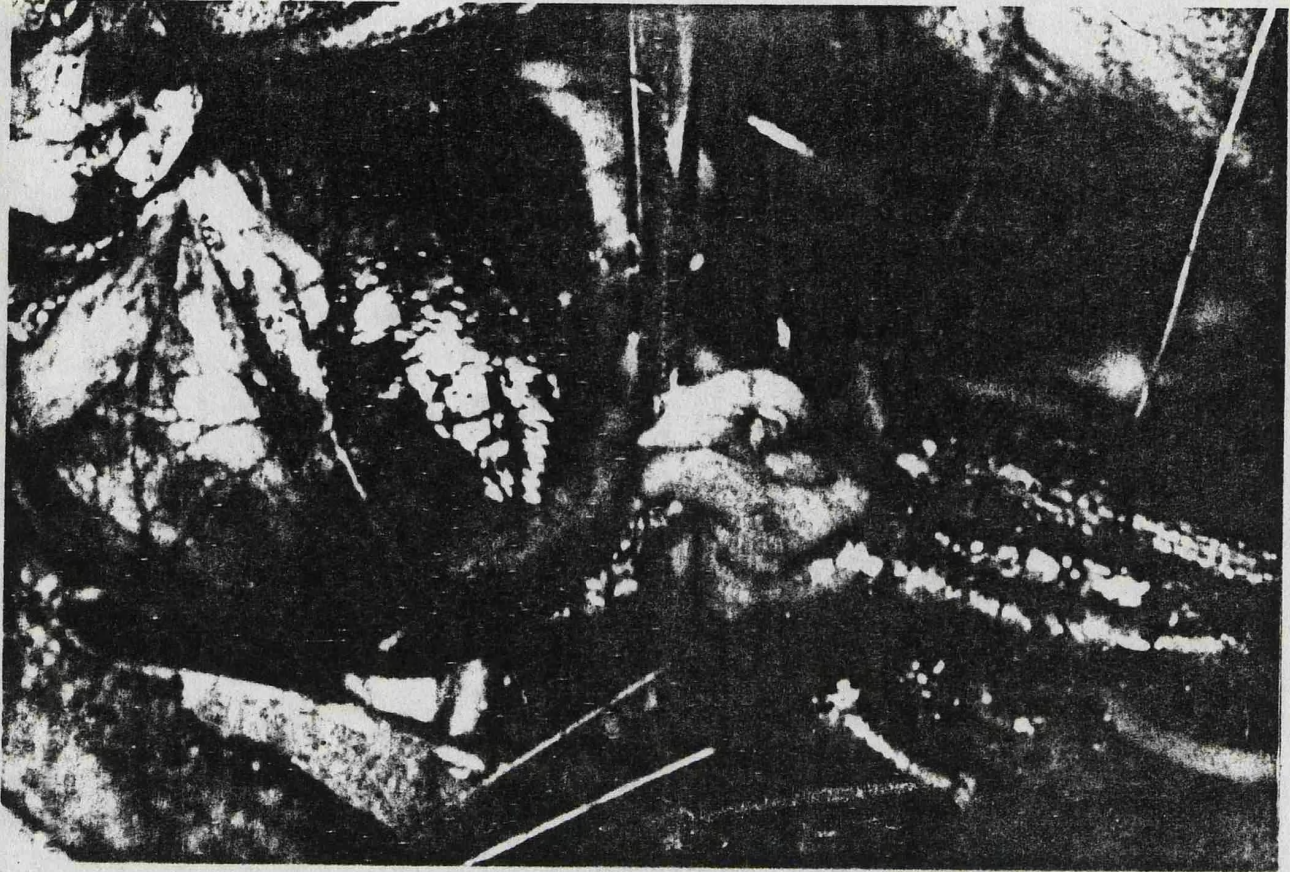


Fig. 11 Preparación cardiopulmonar autoperfundida.  
Disección de la aorta torácica.



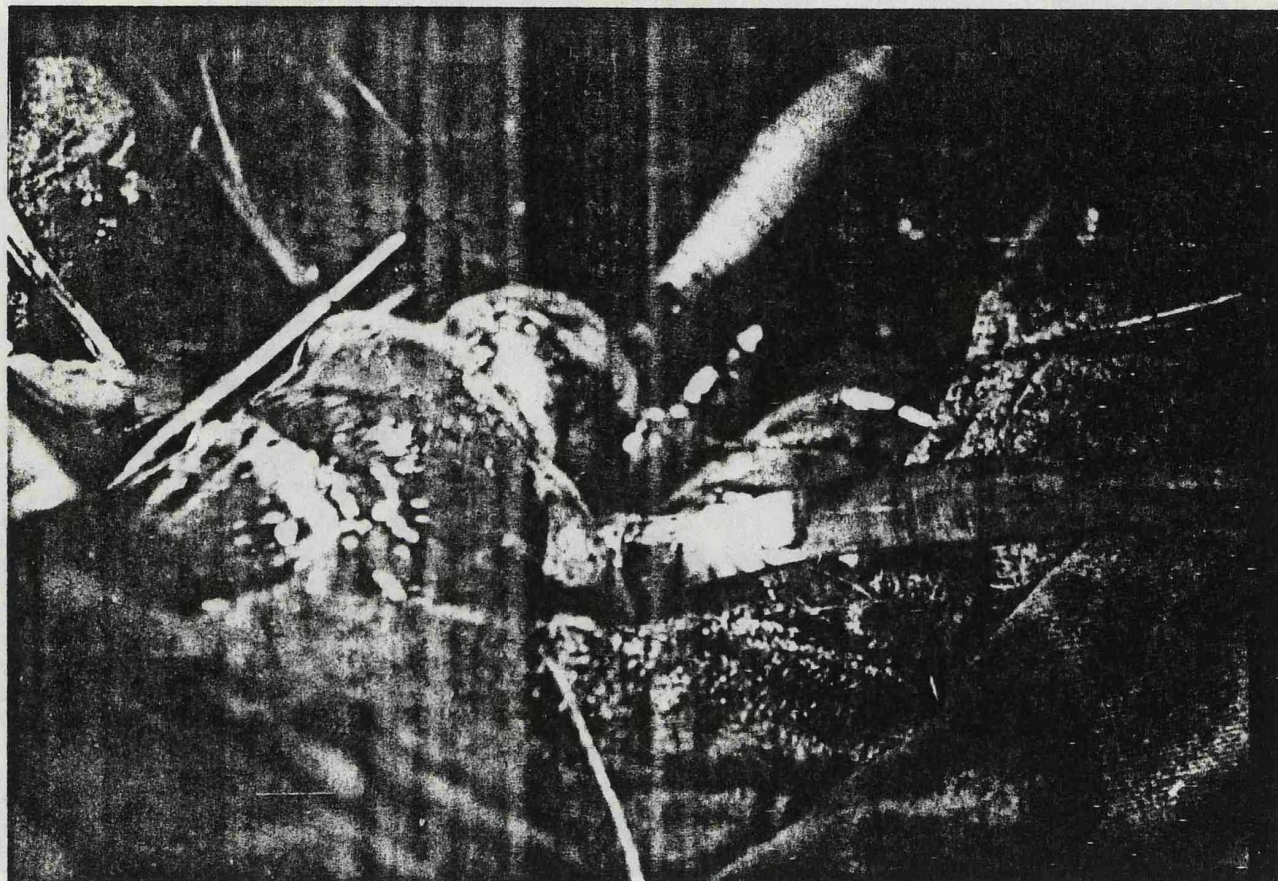


Fig. 12 Preparación cardiopulmonar autoperfundida.  
Introducción en la orejuela derecha del ca  
teter de retorno.





Fig. 13 Preparación cardiopulmonar autoperfundida.  
Introducción del cateter de salida en la  
aorta torácica.



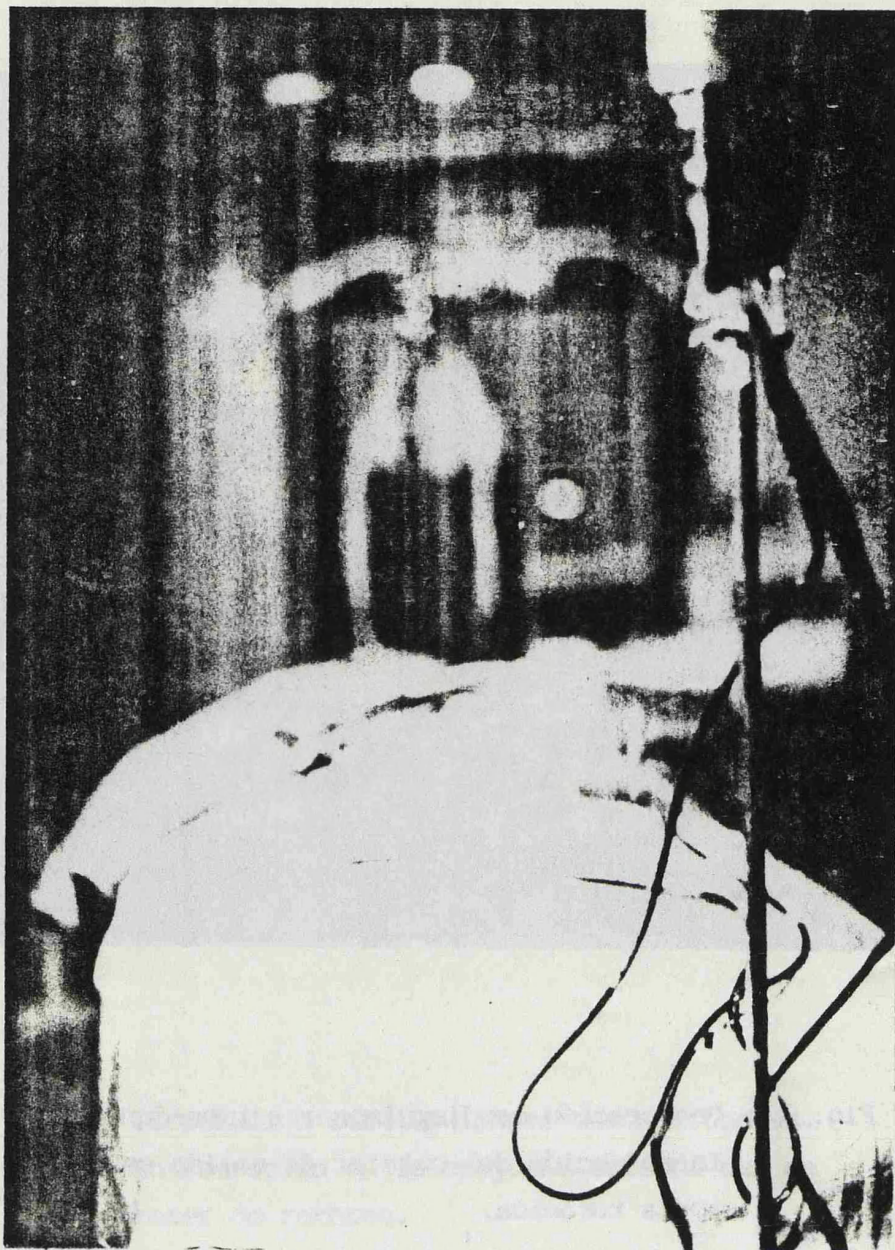


Fig. 14. Vista panorámica del circuito extracorpóreo en una perfusión pulmonar autoperfundida.



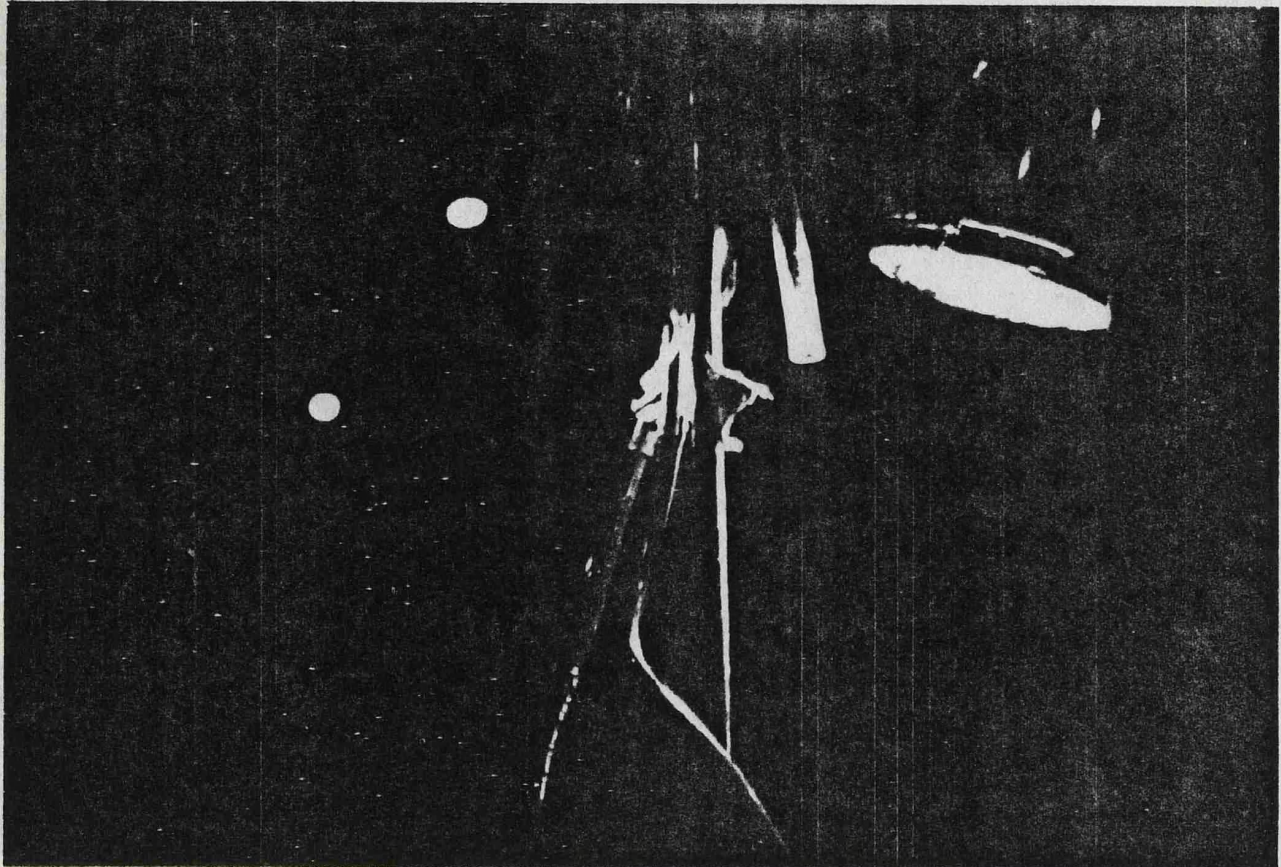


Fig. 15 Línea de salida arterial. Reservorio y línea de retorno venoso.



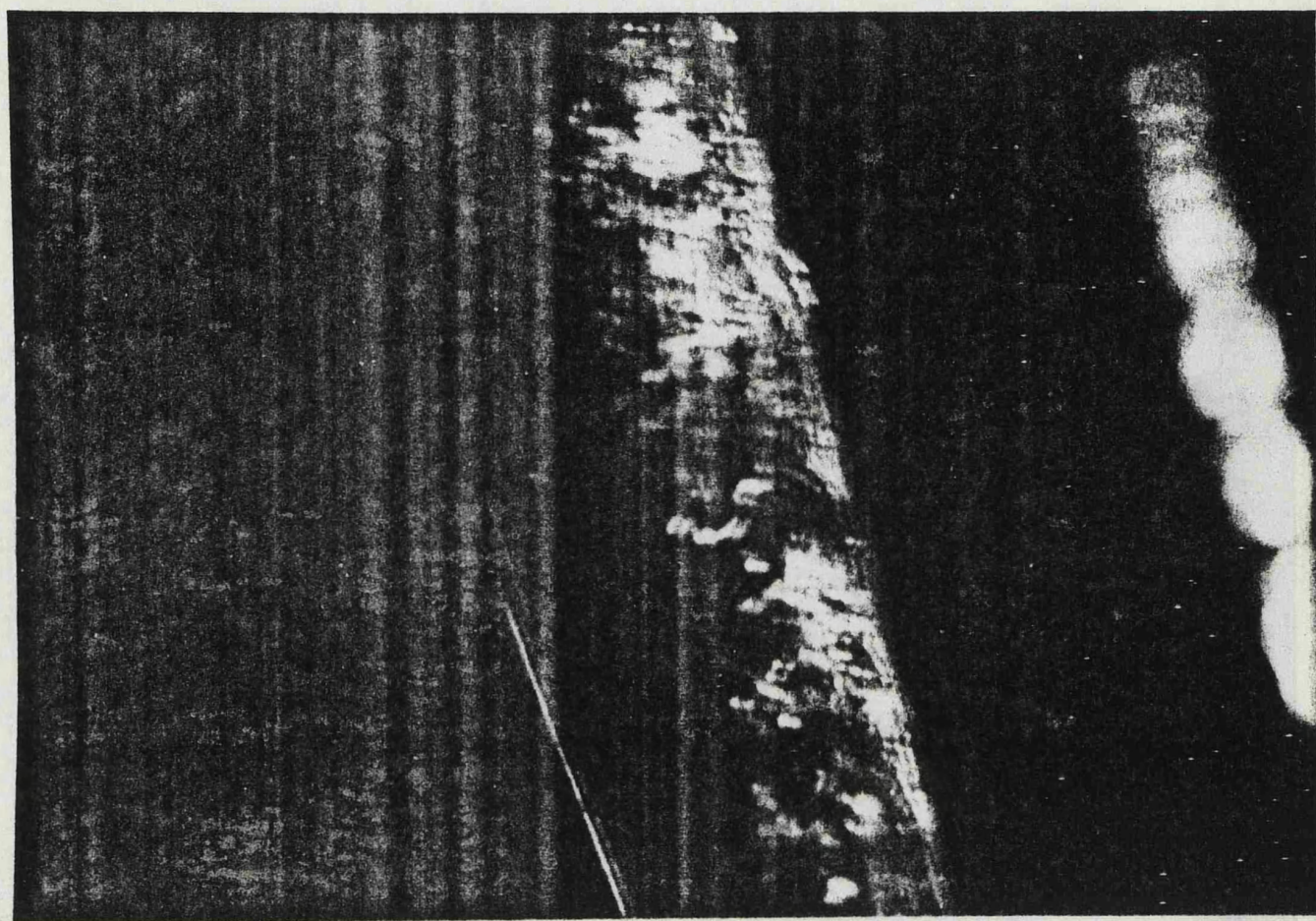


Fig. 16 Preparación cardiopulmonar autoperfundida.  
Línea de salida arterial. Detalle del re -  
gimen de turbulencia de la sangre en cir -  
culación.

que por facilitación en las maniobras se introduzca el catéter en dirección proximal desde la aorta torácica baja Figs. 12 y 13.

- 1) Tras la estabilización de la preparación ante esta situación nueva y tras la recuperación de casi la totalidad de la sangre circulante del animal hacia el circuito del reservorio, se realiza la ligadura de la vena cava superior.
- 11) Ligadura de la vena cava inferior.

Tras esta última ligadura se obtiene la preparación cardio-pulmonar aislada, autoperfundida, sin conexión alguna con el resto del organismo. Se realiza el siguiente circuito: la sangre bombeada por el ventrículo izquierdo a través de la aorta, alcanza el reservorio, desde el cual por gravedad retorna a la aurícula derecha. Tras la circulación pulmonar se inicia un nuevo ciclo Figs. 14, 15 y 16.

Con el fin de no distorsionar los pedículos vasculares la mayoría de las preparaciones se establecieron "in situ", mientras que cuatro fueron extraídas del tórax, colocándose la preparación en un recipiente a propósito con solución salina fisiológica. Este aislamiento completo aunque complica marcadamente el procedimiento técnico, no se sigue de disminución alguna en el posterior rendimiento de la preparación. En este caso, antes de proceder a las diferentes canalizaciones de salida y de entrada, pero después de colocar los

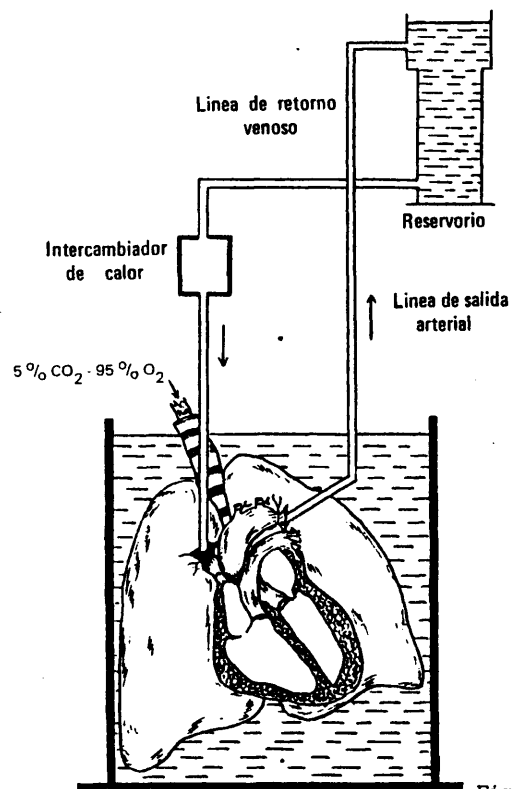


Fig. 17

Diagrama simplificado de la preparación cardio-pulmonar  
autoperfundida "aislada"



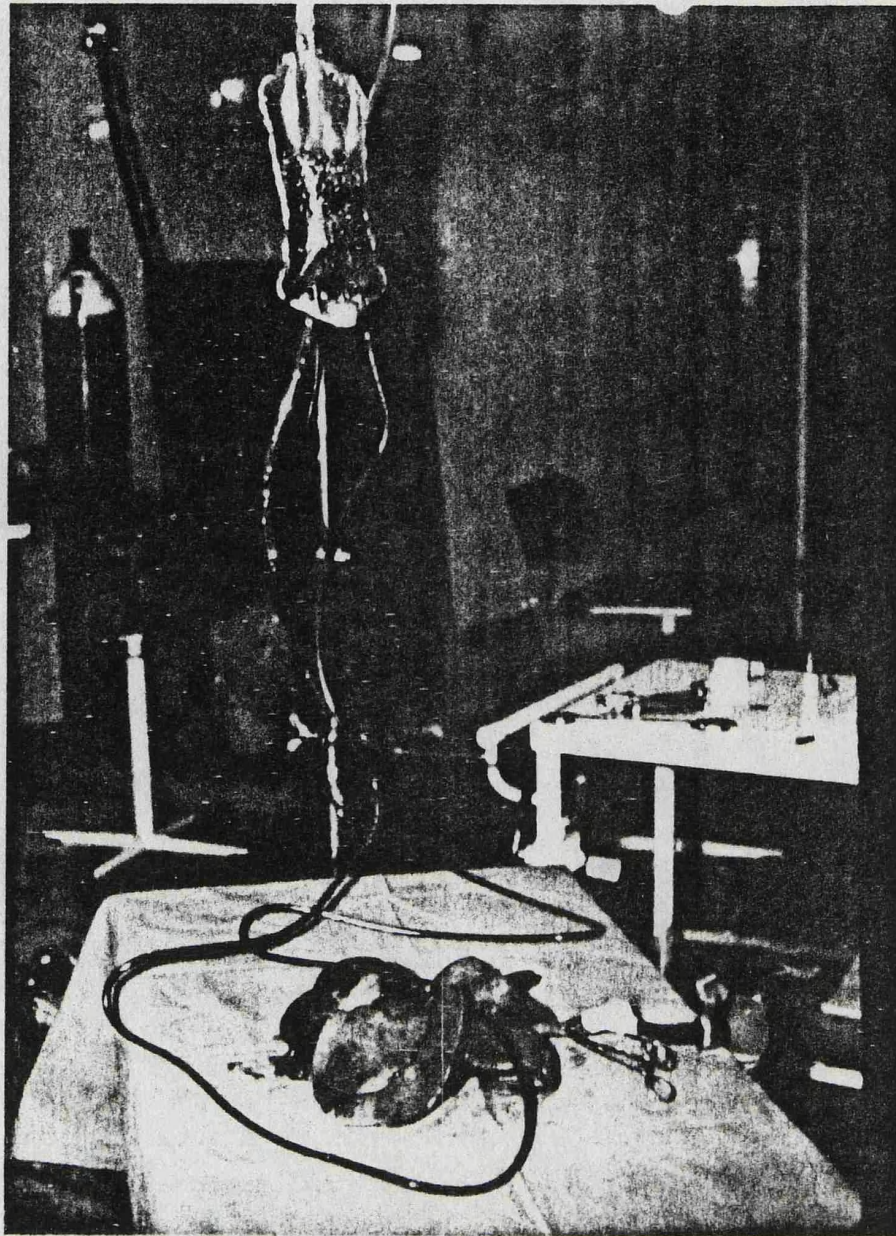


Fig. 18 Preparación cardiopulmonar autoperfundida. Panorámica de la preparación aislada.



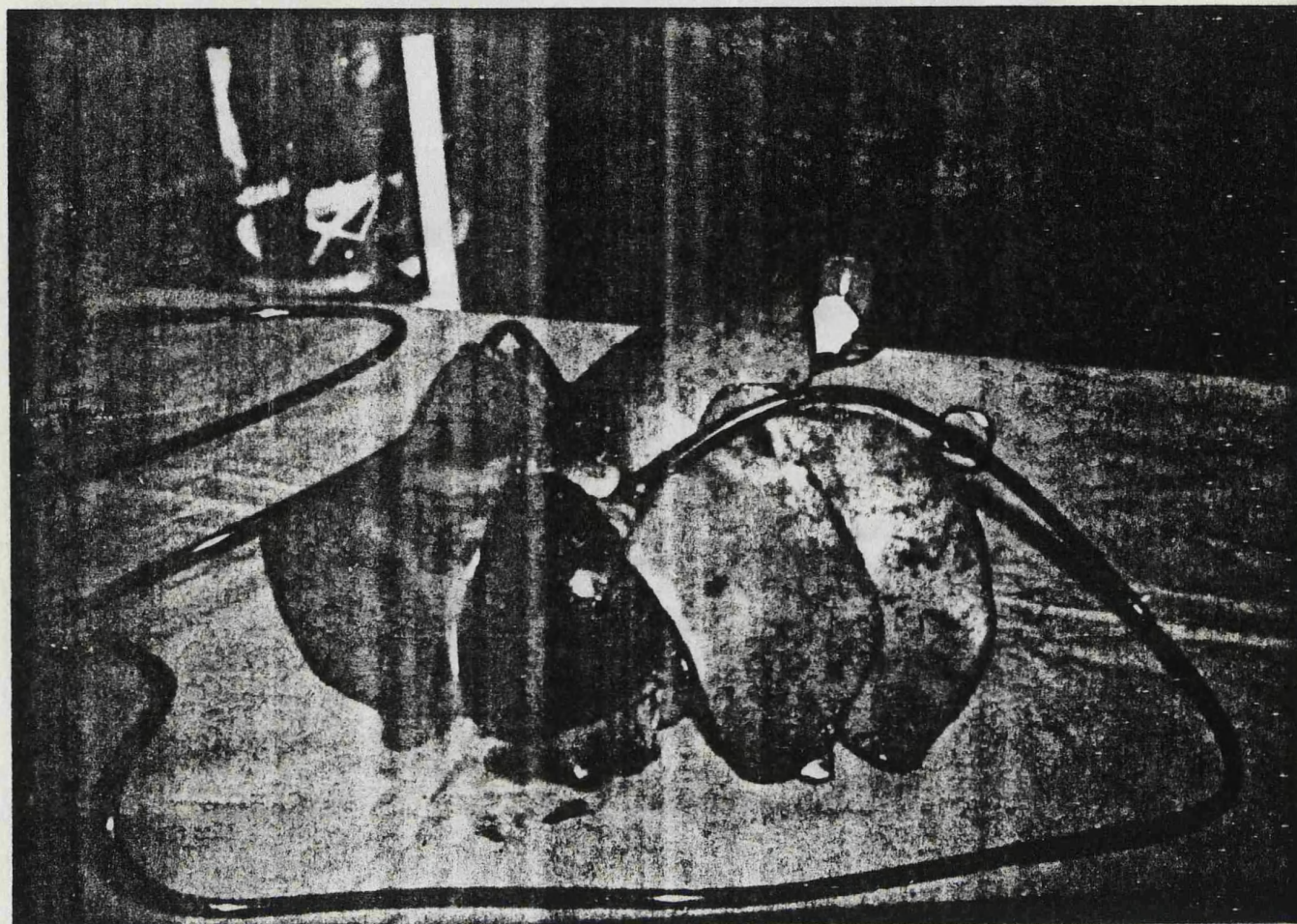


Fig. 19 Preparación cardiopulmonar autoperfundida.  
Detalle de la preparación aislada, en la  
que se observan el aspecto macroscópico  
pulmonar normal y la capacidad contráctil  
cardíaca.

catéteres de registro de presión arterial y venosa se verifica el aislamiento total del complejo corazón-pulmón liberándolo de todas sus estructuras de fijación (Figs. 17, 18 y 19).

El sistema presenta una gran simplicidad; la oxigenación corre a cargo de los propios pulmones que son ventilados "fisiológicamente", mientras que el bombeo de la sangre lo hace el corazón de la preparación.

El circuito es "cebado" inicialmente en su línea de retorno con solución de glucosa al 5% y aproximadamente en una cantidad que oscila alrededor de 150 ml. Posteriormente la sangre del propio animal terminará de rellenar la totalidad del sistema, con lo que habremos practicado una especie de exanguinación del lecho vascular sistémico en el reservorio.

A<sub>1</sub>.- Preparación cardio-pulmonar asistida. La técnica quirúrgica básica realizada es idéntica a la anterior con la salvedad de la interposición de un sistema de bombeo mecánico en el circuito. En este caso la conexión entre la aorta y el circuito se verifica mediante un sistema en "Y" e tal manera que una de las ramas conducen al circuito principal y la otra inicialmente ocluida pasa a través de la máquina de bombeo y de allí se proyecta hacia el reservorio general. En caso de fracaso cardíaco espontáneo o provocado, la sangre será retirada desde el cono de salida ventricular hacia la bomba que será la encargada de impulsarla hacia el reservorio, desde el cual lo

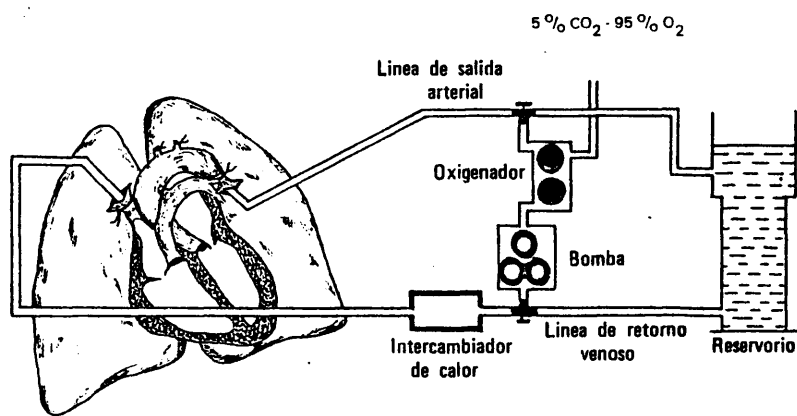


Fig. 20

Diagrama simplificado de la preparación cardio-pulmonar autoperfundida  
"mecánica o asistida"

mismo que ocurría cuando la sangre era impulsada por el corazón, retornará hacia el ventrículo derecho y desde éste por simple gravedad perfundirá el circuito pulmonar de baja presión. (Fig. 20).

B.- Perfusiones hepáticas. Dentro de este apartado cabe distinguir la técnica quirúrgica de aislamiento de la víscera y el sistema de perfusión utilizado, donde a su vez describiremos la perfusión hepática acoplada a una preparación cardio-pulmonar (sistema de perfusión autóloga) y el sistema de perfusión de hígado aislado, con bomba y oxigenador (mecánico).

La preparación quirúrgica y técnica empleadas es la misma que la descrita en la preparación cardio-pulmonar. En este caso se realiza una toraco-frenolaparotomía media identificando y aislando los pedículos de:

- Arteria hepática
- Vena porta
- Colédoco distal

Dependiendo de la elección del sistema de perfusión podremos realizar.

B<sub>1</sub>- Acoplamiento a preparación cardio-pulmonar

"in situ"

"aislado"

B<sub>2</sub> - Mecánica

B<sub>3</sub> - Hepato-renal

Acoplamiento a preparación cardio-pulmonar "in situ"

Se verifica la preparación cardio-pulmonar standard. Flujo arterial hepático se realiza a través de la arteria hepática,

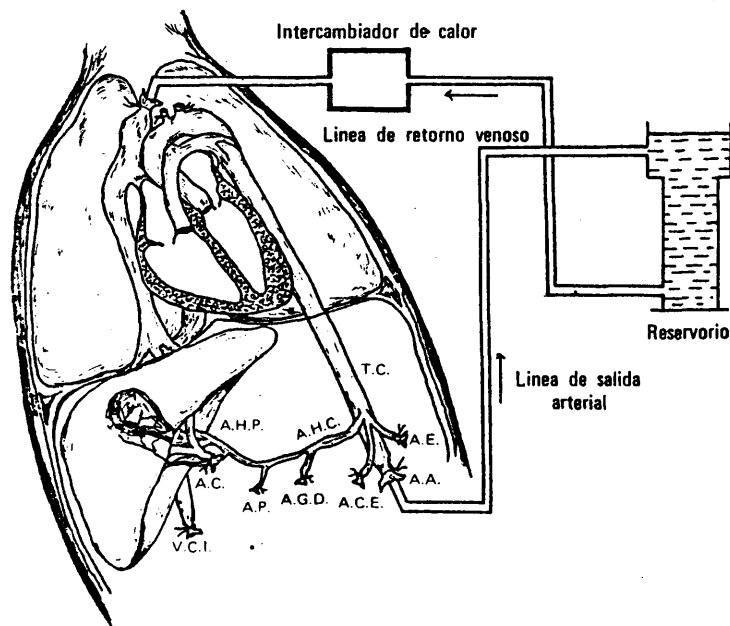


Fig. 21

*Diagrama de la preparación hepática autoperfundida "in situ"*

A.A.: Aorta Abdominal	T.C.: Tronco celiaco	A.E.: Arteria Esplénica
A.H.C.: Arteria Hepática Común	A.C.E.: Arteria Coronaria Estomáquica	
A.G.D.: Arteria Gastro-Duodenal	A.P.: Arteria Pilórica	A.C.: Arteria Cística
A.H.P.: Arteria Hepática Propia	V.C.I.: Vena Cava Inferior	

habiéndose ligado previamente todas las arterias nacidas de la aorta y comprendidas entre los troncos supraaórticos y la salida de la arteria hepática (arterias intercostales, bronquiales, esofágicas, diafragmáticas y tronco celíaco a excepción de la arteria pilórica y hepática), teniendo en cuenta que la salida de la aorta hacia el reservorio se hará por debajo de dicha arteria. El drenaje venoso se obtiene a través de la suprahepática, habiéndose ligado previamente la vena cava inferior por debajo de las mismas. (Fig. 21).

Acoplamiento a preparación cardio-pulmonar "aislada".

En este caso las líneas generales de la técnica quirúrgica son similares a las de la preparación "in situ", la única diferencia consiste en que para facilitar las maniobras de aislamiento del bloque visceral pueden sacrificarse los pedículos arteriales conectándolos con catéteres a la salida de la aorta, mientras que el drenaje venoso se mantiene a través de la suprahepática, manteniéndose por tanto la unidad entre suprahepática y vena cava inferior. En cualquier caso la preparación aislada no es más que una preparación "in situ" que se ha extraído fuera del animal. (Figs. 22, 23 y 24).

Preparación hepática "mecánica". Una vez identificados y hallados los pedículos vasculares y biliar del hígado y previa heparinización, se procede a la desconexión de los mismos, trasladando la viscera a un recipiente especial, bañada en una solución salina isotónica a 37°centígrados. Con la viscera en esta situación se procede a la perfusión de la misma mediante la conexión de la arteria hepática y vena porta al sistema de eyección de bombeo, mientras que el retorno venoso recogido por gravedad es desviado hacia el oxigenador mecánico (Fig.25). Dicho retorno puede efectuarse de dos formas en virtud de la técnica de perfusión empleada:

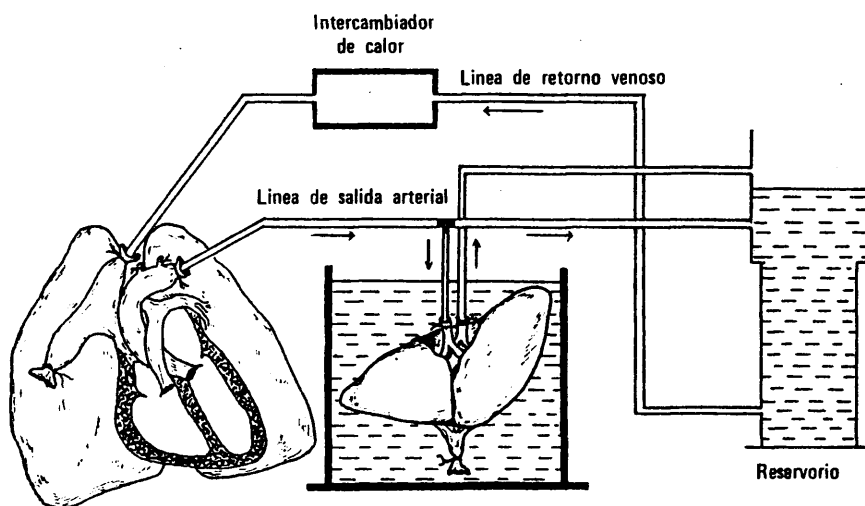


Fig. 22

*Diagrama de la preparación hepática autoperfundida "aislada"*

La perfusión hepática, se realiza a través de una conexión en T intercalada en la línea de salida arterial, el retorno venoso se realiza a través de la vena Porta, se ha ligado la vena Cava Inferior.





Fig. 23. Perfusión hepática aislada. Detalle del drenaje venoso a través de la vena cava inferior. Preparación en la que se verificó la perfusión a través de la arteria hepática y vena porta.



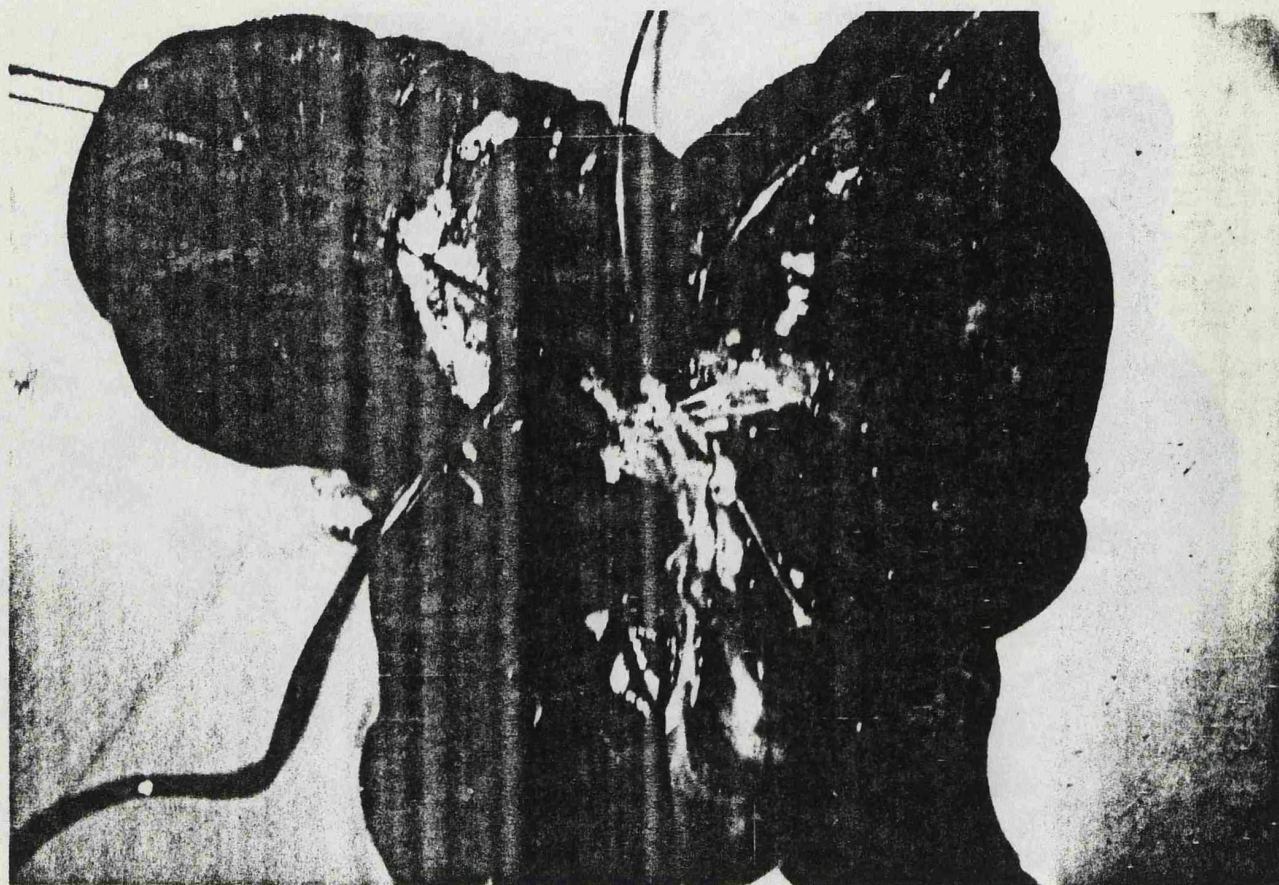
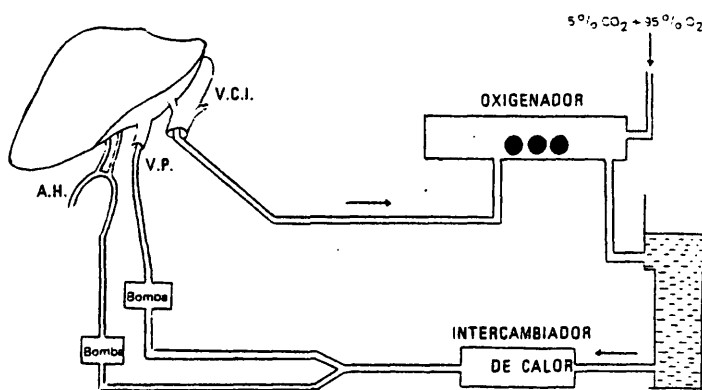


Fig. 24 Perfusión hepática aislada, en la que se muestra la colocación de los distintos catéteres. 1- arteria hepática; 2- vena porta 3- colédoco. El retorno venoso se realiza por la cava inferior vía de la suprahepática.



Perfusión de hígado aislado en el perro. Diagrama simplificado del circuito de perfusión

Fig. 25

V.C.I.: Vena Cava Inferior V.P.: Vena Porta A.H.: Arteria hepática



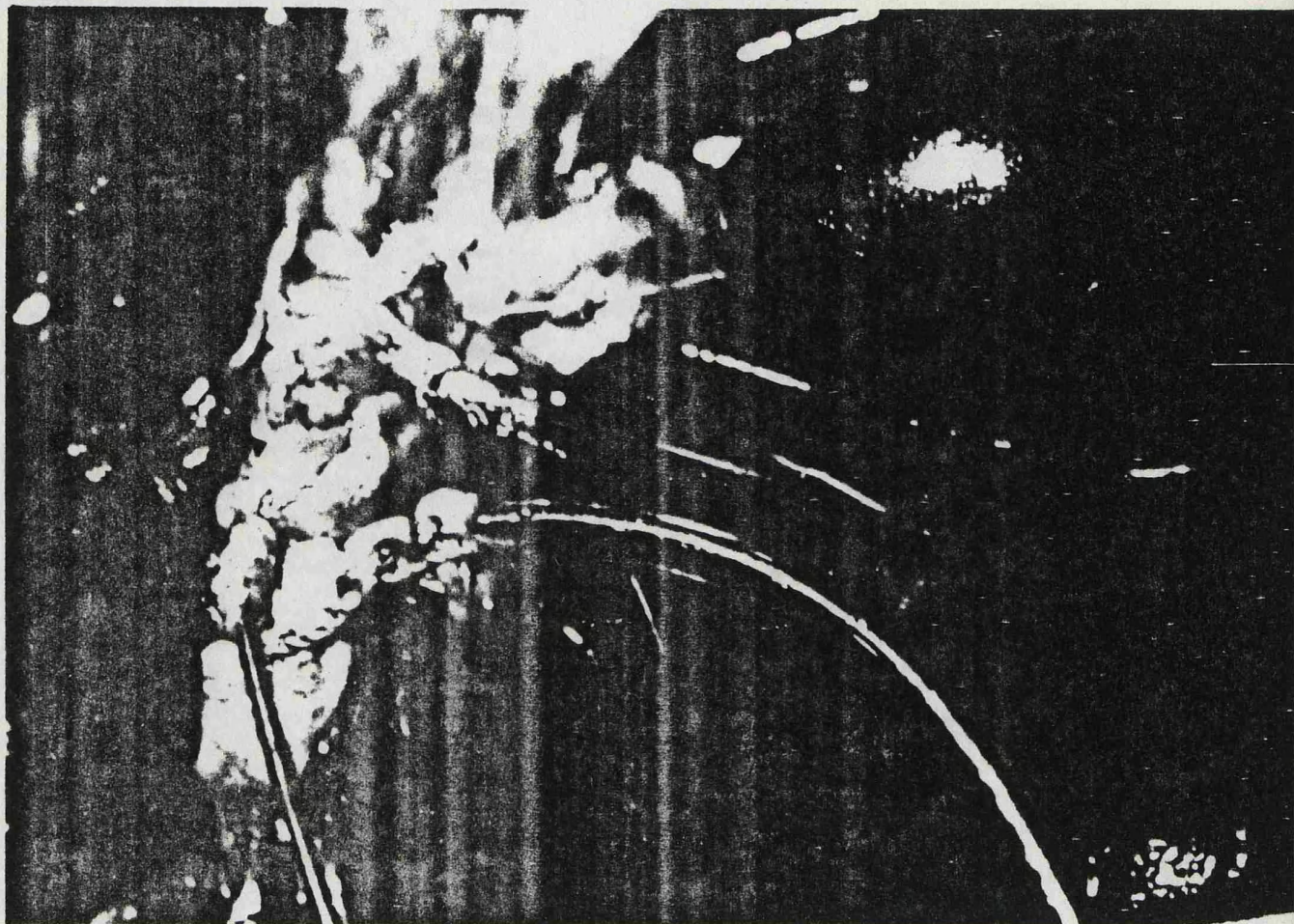


Fig. 26    Perfusión hepática aislada. Detalle del hilio hepático, donde se muestra un sistema de perfusión mecánica a través de la arteria hepática, con retorno venoso retrógrado por la vena porta, ligadura de la suprahepática y cateterismo biliar.



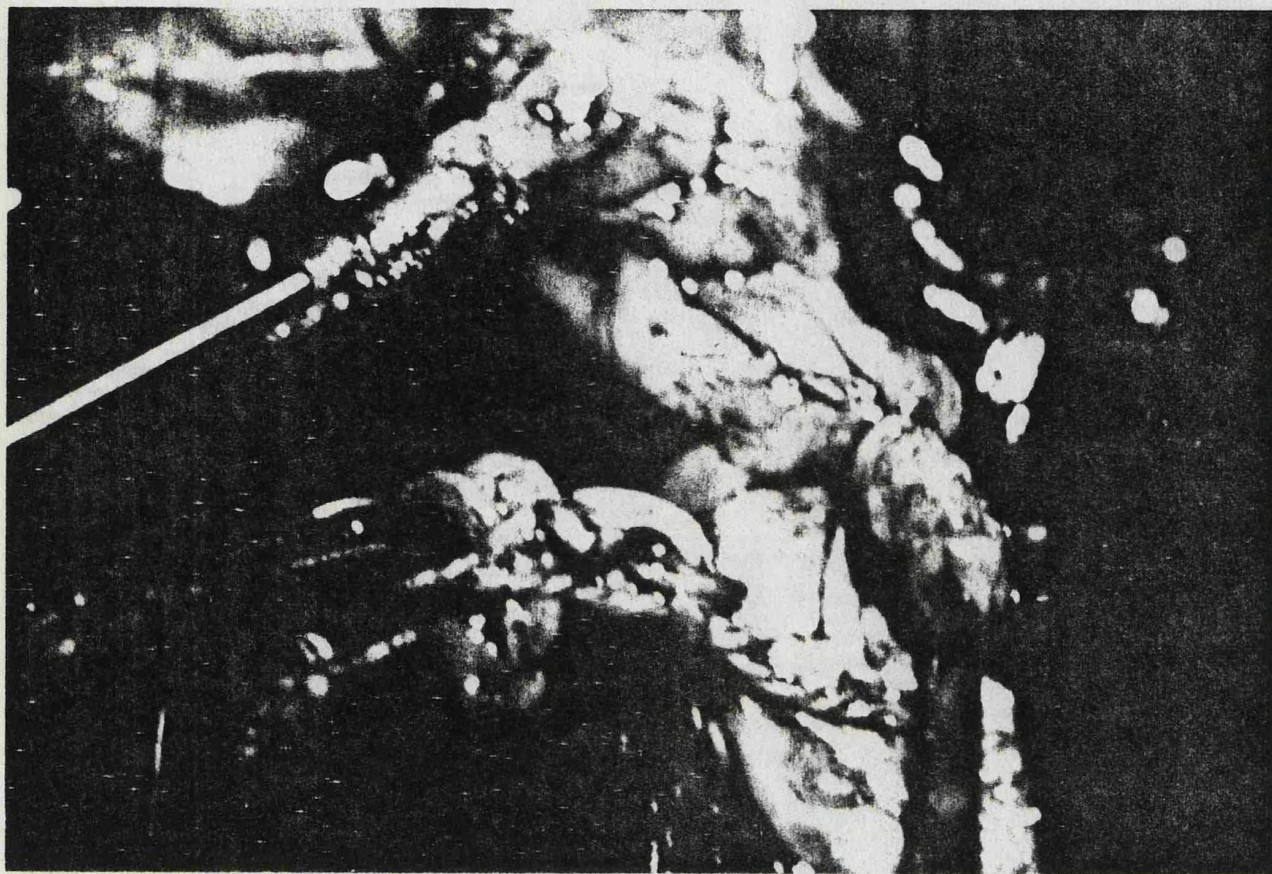


Fig. 27 Perfusión hepática aislada. Detalle del hilio hepático, en el que se comprueba una normal función hepática, en virtud de un flujo biliar conservado y evidente. Perfusión a través de la arteria hepática con retorno venoso retrógrado por la vena porta.

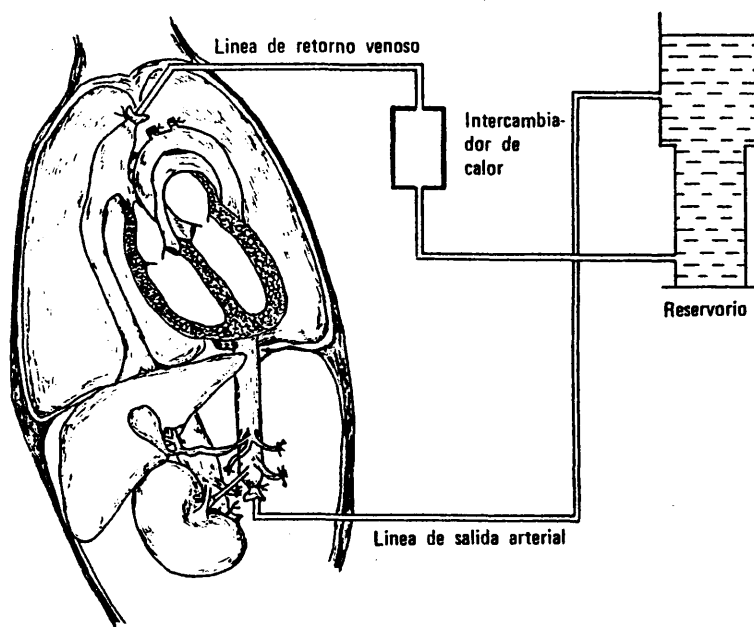


Fig. 28

*Diagrama simplificado de la preparación hepato-renal autoperfundida "in situ"*

1. Perfusión a través de la arteria hepática y/o vena porta, con retorno anterógrado a través de la vena cava inferior vía de la suprahepática (Fig.25).
2. Perfusión a través de la arteria hepática con retorno retrógrado vía vena porta, con ligadura de la suprahepáticas. (Figs. 26 y 27).

Preparación hepato-renal. En el caso de diseñar esta doble perfusión, puede utilizarse el mismo sistema de bombeo para la perfusión de ambas vísceras, dispuestas en paralelo, de tal forma que el retorno venoso, aún con posibilidades de ser estudiado por separado se recupere conjuntamente en un reservorio único. (Fig. 28).

C.- Perfusiones renales. En las preparaciones renales distinguimos al igual que en el grupo anterior aquellas perfusiones que se han realizado mediante un sistema de perfusión -oxigenación autólogo y aquellas otras en las que la perfusión ha sido enteramente mecánica.

El sistema anatómico renal del perro es similar al humano, con la única salvedad de que las cápsulas suprarrenales son independientes, situándose dichas glándulas inmediatamente por debajo del diafragma, dorsal y lateralmente a la vena cava inferior (en el perro denominada post-cava) en el lado izquierdo, mientras que en el derecho aparece ventral y lateralmente a la aorta abdominal. Tras liberar el riñón de su celda, se procede a la disección del pedículo vascular, conservando una zona tanto de la cava como de la aorta y conservando igualmente unos 5 cms. del uréter. En el perro es casi constante la existencia de una vena y de una arteria única. Una vez aislado el riñón se

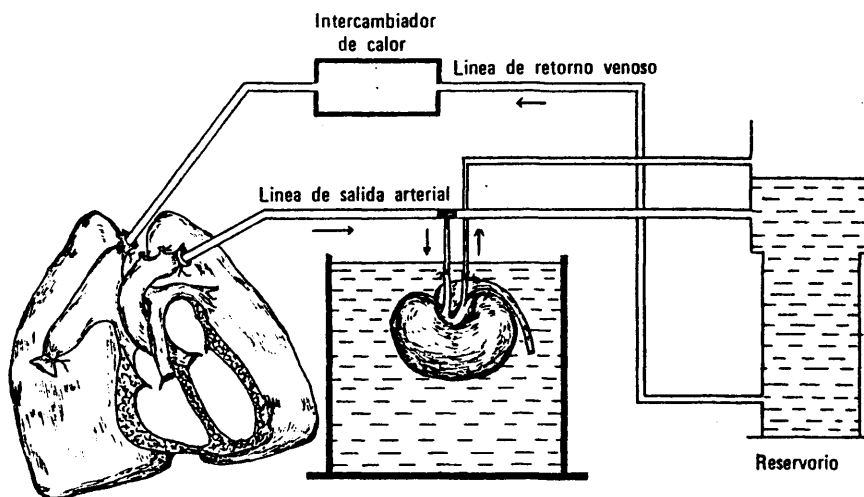


Fig. 29

*Diagrama de la preparación renal autoperfundida*

La conexión renal se realiza a través de una conexión en T, intercalada en la línea de salida arterial; el retorno venoso se realiza a través de la vena renal



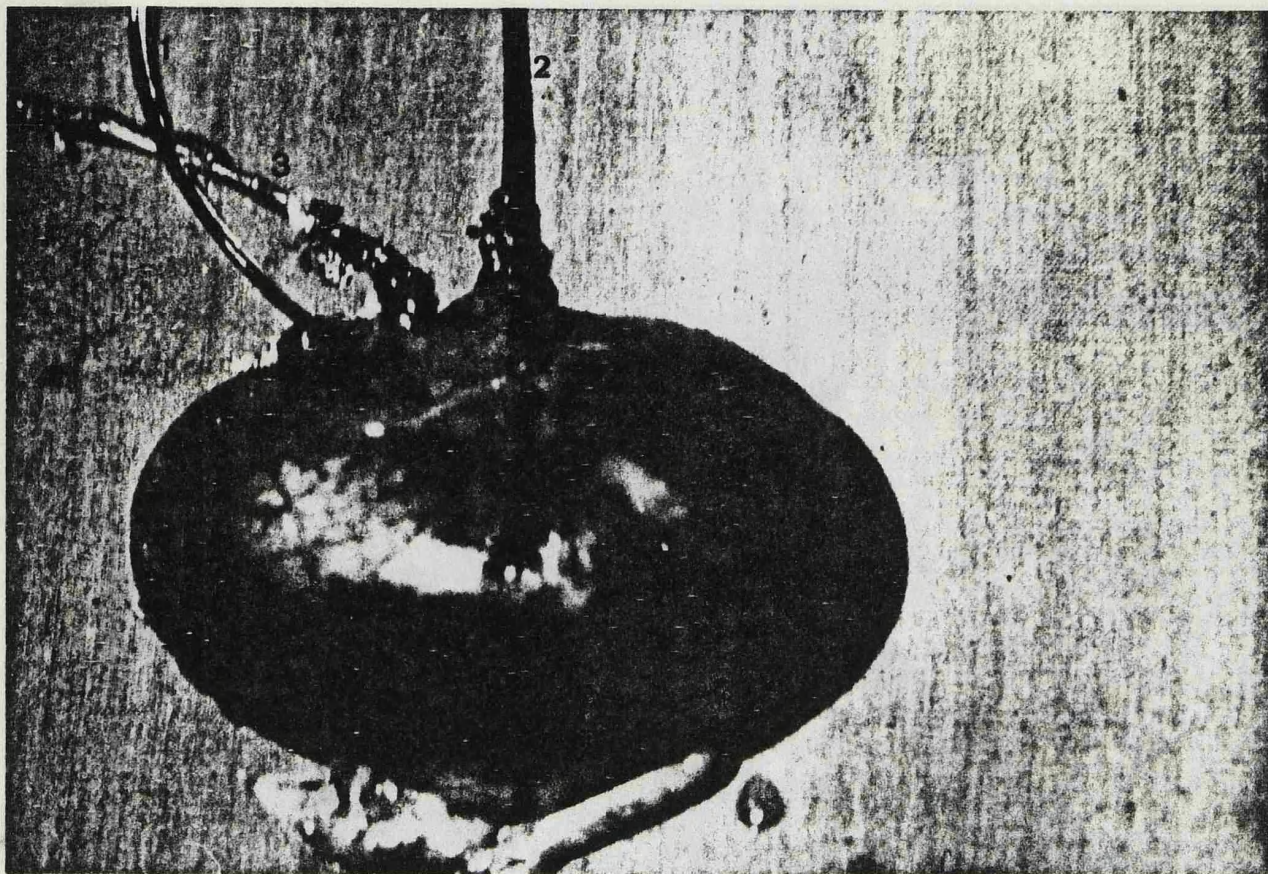


Fig. 30 Preparación renal aislada con perfusión mecánica. Esquema de la disposición de los catéteres. 1- arteria renal; 2- vena renal; 3- uréter.



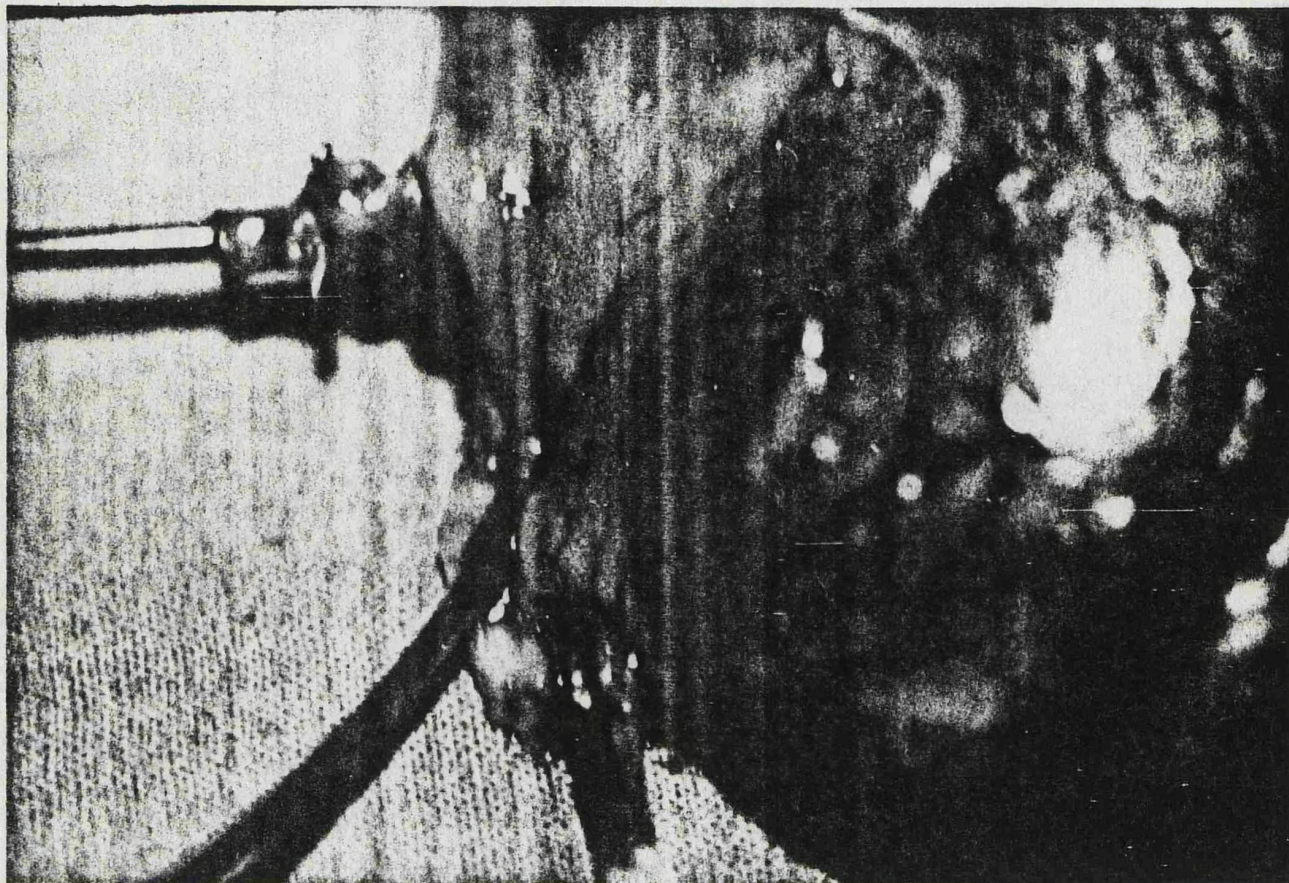


Fig. 31 Preparación renal. Perfusión renal mecánica.  
Detalle del hilio renal.

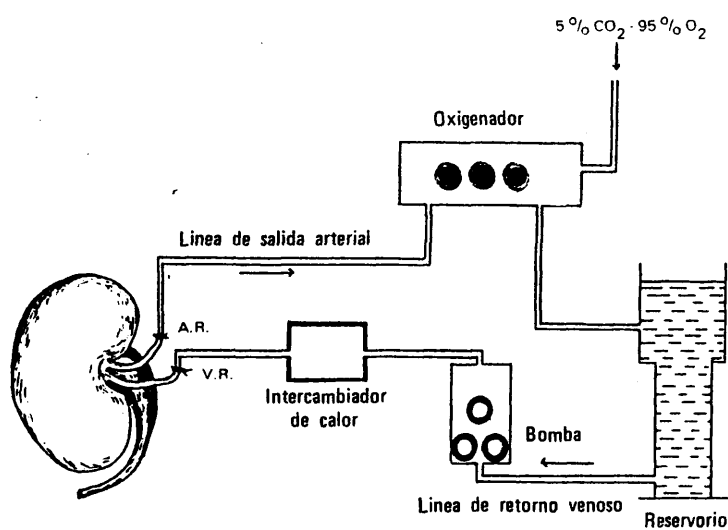


Fig. 32

Perfusión de riñón asistido en el perro "mecánica o asistida"

Diagrama simplificado del circuito.

A.R.: Arteria Renal

V.R.: Vena Renal

lava a través de su pedículo arterial con solución salina heparinizada y a la que se le ha añadido furosemide, encontrando una vez completada la preparación renal dos posibilidades:

1. Podrá acoplarse a un sistema autólogo de perfusión de manera similar al descrito para la perfusión hepática. (Figs. 29, 30 y 31).
2. Se destinará a una perfusión aislada de tipo mecánico (Figs. 32).

#### Controles de la perfusión

En este apartado nos referimos exclusivamente a los controles efectuados sobre el funcionamiento global del sistema de perfusión:

- Flujo aportado
- Recambio gaseoso
- Intercambio capilar
- Temperatura

- Flujo aportado. Su verificación se ha realizado en función de dos sencillas bases físicas, en los casos en los que se empleo bomba extracorpórea, el gasto ofrecido viene determinado por la capacidad impulsora de la máquina y el diámetro del tubo a emplear. En el caso, en el que las preparaciones utilizaron el propio corazón como bomba impulsora y una vez estabilizado el reservorio, el cálculo del gasto se hizo de manera directa por derivación completa durante 5 segundos de la sangre procedente de la vía de salida hacia un recipiente adicional y previamente graduado. En el caso de las preparaciones mixtas, es

decir, en aquellas en las que se intercaló en el sistema cardiopulmonar una víscera, hígado orión, el gasto ofrecido a dicho órgano, se reguló de forma indirecta mediante la diferencia de  $PO_2$  entre entrada y salida. Iguales determinaciones se realizaron en los niveles de glucosa, junto con la estabilidad de la función básica del órgano en estudio (formación de bilis y formación de orina).

- Recambio gaseoso. El control de la  $PO_2$  y de la  $PCO_2$ , en las preparaciones cardiopulmonares no es solamente el índice que señala la regulación de unos parámetros fundamentales, sino que es en sí la expresión más fidedigna de la fisiología de los órganos en estudio. Sin embargo en el presente apartado nos referimos exclusivamente al hecho de la necesidad de mantener un intercambio gaseoso normal en el líquido de perfusión, ya sea sangre o un sustituto de ésta. En todos los casos la ventilación, tanto usando pulmón autólogo, como oxigenadores de discos o de cualquier otro tipo, ha sido una mezcla oxígeno-carbónico en la proporción 95/5 y en algunos casos una mezcla aire-carbónico con una  $PCO_2$  aproximadamente de unos 35 mm. Hg.

- Intercambio capilar. Los controles realizados, aunque de manera indirecta creemos que reflejan de una forma fiel la normal relación entre capilar y tejido. El parámetro que nos ha servido para tal control, ha sido la relación ac. láctico/ac. pirúvico, realizada repetidamente a la entrada y salida del órgano. Hemos aceptado que una normal relación entre dichos parámetros representará del mismo modo una normal función del territorio capilar. El segundo parámetro que hemos elegido como reflejo de una función fisiológica a nivel del territorio de la microcirculación, y a su vez signo indirecto de una buena función linfática, ha sido el volumen del líquido intersticial

determinado mediante la resistencia de un tejido al paso de la corriente eléctrica y que es variable en función de la cantidad de líquido presente. Estas determinaciones se realizaron mediante medidores de corriente que establecen la diferencia por lectura directa entre la resistencia de un tejido sano del mismo sistema y el tejido a considerar.

- Temperatura. En la totalidad de los experimentos realizados, a excepción de aquellos que estuvieron destinados a un mero entrenamiento técnico, la temperatura mantenida osciló entre 37 y 38°, lográndose según hemos indicado anteriormente por calentamiento de las líneas de entrada y de salida del reservorio, mientras que los órganos se mantuvieron "in situ" bañados con una solución salina fisiológica a la misma temperatura.

#### Estudio de la función

Todas las determinaciones fueron realizadas con el sistema automático SMA-12 compacto fabricado por la Technicon Instruments Corporation. (Plus). (Fig. 33).

pH sanguíneo.-La medida del mismo se realiza por el sistema de gases sanguíneos Corning 175. En síntesis consta de un electrodo de vidrio capilar, una membrana de diálisis una solución tampón (puente de sal) de CLK y un electrodo de referencia Ag/CLAg.

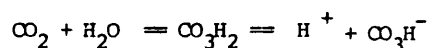
PCO<sub>2</sub>.- La determinación de dicho valor se efectúa con un electrodo específico del tipo descrito por Stow y Severinghaus. Dicho electrodo consta de un terminal de vidrio sumergido en una solución electrolítica, separado de la mues-

tra de sangre por un espaciador y una membrana de caucho siliconado permeable al  $\text{CO}_2$  gaseoso. El pH de la solución depende de su  $\text{PCO}_2$  y que a su vez estará en equilibrio con el valor que se tenga de la muestra a analizar. La salida del electrodo  $\text{PCO}_2$  se calibra con dos patrones de  $\text{CO}_2$  gaseoso conocido.

$\text{PO}_2$ .- Para esta determinación se utiliza un electrodo descrito por Clark para la medida de la presión parcial de oxígeno. Ese electrodo está compuesto por un cátodo de platino, un ánodo de  $\text{Ag/ClAg}$ , una solución electrolítica de llenado y una membrana de propileno. El oxígeno procedente de la sangre se difunde a través de la membrana en la solución de llenado y se reduce en el cátodo. La magnitud de la corriente resultante indica la presión parcial del oxígeno de la muestra.

Bicarbonato.- Una vez realizadas las medidas directas de pH,  $\text{PO}_2$  y  $\text{PCO}_2$ , el medidor Cornig 175, calcula automáticamente otra serie de valores mediante un micro-procesador.

La relación  $\text{PCO}_2$ /Bicarbonato, se expresa por la siguiente ecuación:



Esta relación en una muestra de sangre depende del estado de equilibrio ácido-base y es de gran utilidad en nuestro caso para valorar el estado metabólico consecutivo a la perfusión. El SMA utiliza la fórmula de Henderson-Hasselbach, para el cálculo del bicarbonato:

$$\text{pH} = \text{pK} + \log. \frac{\text{Bicarbonato}}{\text{Ácido carbónico}}$$

Siendo pK la constante de equilibrio, como conocemos el pH y la  $\text{PCO}_2$ , el micro-procesador hará automáticamente el cálculo de bicarbonato.

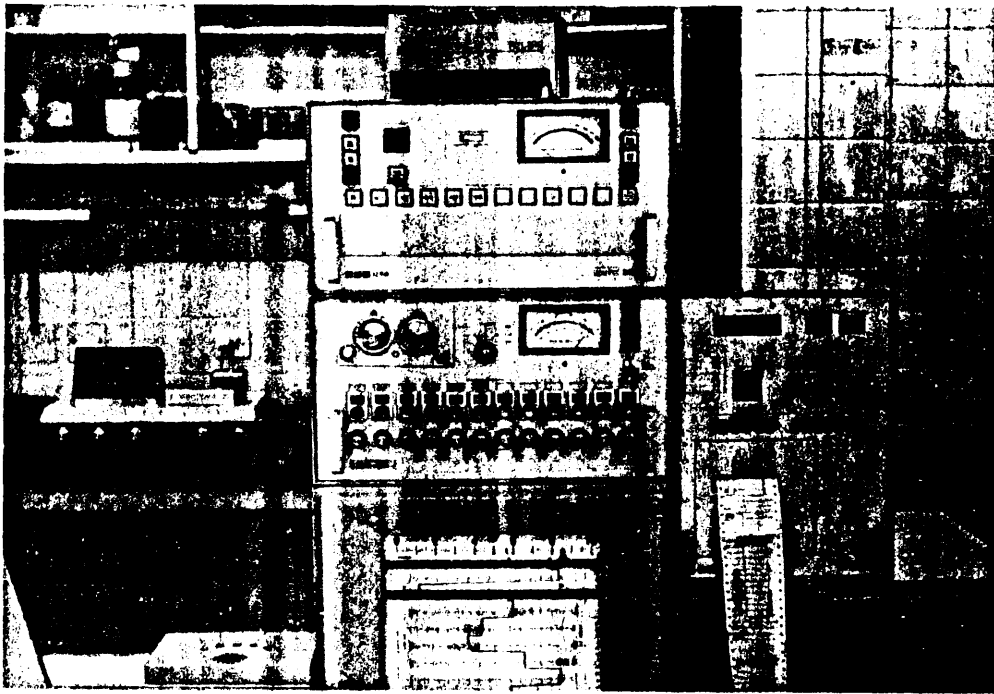


Fig. 33 SMA - 12. Compacto fabricado por TECHNICON INSTRUMENTS CORPORATION - PLUS -. Para determinaciones bioquímicas.

Sodio y Potasio plasmáticos.- Estas determinaciones se realizaron por fotometría de llama, equipo IL n°243 flame Phothometer.

El suero es aspirado por una bomba peristáltica a la vez que una solución de litio y de agua que producen una dilución de la muestra de 1/100. El líquido obtenido es aspirado por efecto Venturi pulverizándose posteriormente por medio de un compresor. El aerosol así formado consta de gotas de diferentes tamaños. Las más gruesas caen por su propia densidad y se eliminan, mientras que las pequeñas son arrastradas por una corriente de aire hacia un quemador de propano. Se forma una llama de tipo turbulento. El agua de las gotas se evapora mientras que el residuo se volatiliza produciendo la disociación de los elementos sodio, potasio y litio, los cuales al volver a su estado "fundamental", emiten radiaciones características cuya intensidad de radiación estará en función del número de átomos. El espectrofotómetro posee tres detectores con sus filtros correspondientes que transforman los datos en una corriente eléctrica que tiene su expresión en un registrador directo digital.

Calcio.- Fue igualmente realizada su determinación por el SMA Technicon. Este equipo trabaja con la metodología de flujo continuo, las muestras son aspiradas por medio de una bomba peristáltica durante 94 segundos y distribuidas a los 6 canales. En su flujo las muestras son dializadas y posteriormente se les incorporan los reactivos determinantes de color, sobre los que el fotómetro produce una señal eléctrica que el procesador electrónico transforma en unidades de concentración.



Ac.láctico.- Se realizó con el test de la casa Boehringer, según el método de Kutmann y Wahlefeld, que emplea como reactivos un tampón de glicina más hidracina y como desproteizante de la sangre extraída ácido perclórico 0,6 N. se emplea una cubeta de un centímetro de paso de luz a 365 nm. de longitud de onda y a una temperatura de 25°

Piruvato.- Se realizó igualmente con el test de la casa Boehringer según los métodos de Czok y Lamprecht, que emplean como reactivos un tampón de fosfato tripotásico y como desproteinizante de la sangre ác. perclórico 1,0 N. Se lee la determinación con una cubeta de un centímetro de paso de luz a 365 nm. de longitud de onda y una temperatura de 25°

Isótopos.- Los iones marcados y los ácidos grasos marcados (acetato marcado con tritio; ácido palmítico marcado con  $C^{14}$  y  $P^{32}$ ), se han obtenido a través de Nuclear Ibérica S.A.

#### Estudio estructural

Las microfotografías obtenidas se han logrado en un microscopio electrónico Hitachi-Hu. 12A, con bomba rotativa de aceite al vacío y una gama de aumentos que cubre entre 1.000 a 500.000 por campo. Las microfotografías de nuestra serie corresponden a una gama máxima de 65.000 aumentos. (Fig.34)

La sistemática en la obtención de las preparaciones han sido las siguientes: Tinción con hematoxilina-eosina, fijación con glutaldehído, tratamiento con una solución tampón del ácido cacodílico, inclusión en bloques de resina que se tallan en tronco de pirámide y se cortan con un grosor de

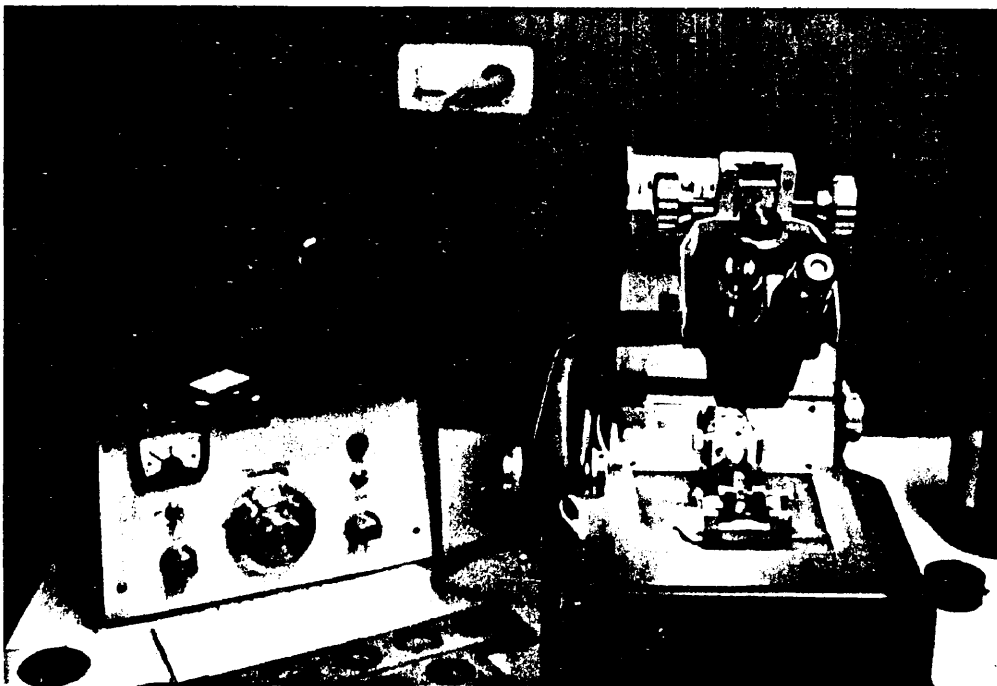


Fig. 34 Ultramicrotomo modelo ULTRATOME LKB III,  
de avance térmico práctico de 100 Å.

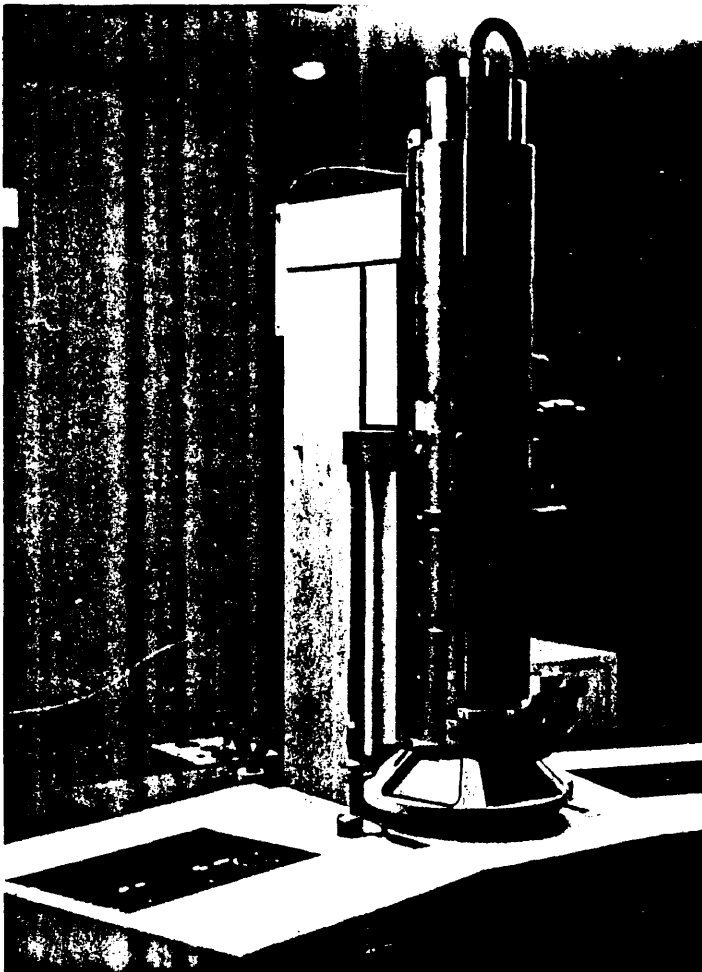


Fig. 35 Microscopio electrónico modelo HITACHI HU 12 A.  
75 Kv. con espectro de aumentos entre 1.000 y  
500.000.

una micra; de esta talla se elige la zona ideal y a su vez se vuelve a tallar a 500/700 Å con el ultra-microtomo (Fig.35) Una vez logrados los cortes, realizados sobre una corriente de agua se trata con acetato de uranilo al 2%, se lava pasán dose acetato de plomo y finalmente una vez lavado de nuevo pasa al microscopio electrónico.

En el microscopio electrónico se coloca la preparación sobre un porta-rejillas, que actuado por un tambor hace directamente la toma de la misma y su colocación en el haz de electrones que pasa a través de la rejilla. Sobre un visor se realiza la elección del campo actuando sobre un zoom incorporado, pudiendo finalmente realizarse la fotografía directamente de la preparación y teniendo en cuenta que en dicho paso se realiza una multiplicación de 3,6 en los aumentos obtenidos por visión directa.

Tabla III.

TABLA RESUMEN DEL TIPO Y NUMERO DE EXPERIENCIAS  
REALIZADAS

- Preparaciones cardio-pulmonares autoperfundidas "in situ" .....	32
- Preparaciones cardio-pulmonares autoperfundidas "aisladas" .....	1
- Preparaciones cardio-pulmonares mecánicas "asistidas" .....	4
- Preparaciones hepáticas autoperfundidas "in situ" .....	16
- Preparaciones hepáticas autoperfundidas "aisladas" .....	1
- Preparaciones hepáticas mecánicas "asistidas" .....	1
- Preparaciones hepato-renales autoperfundidas "in situ" .....	5
- Preparaciones renales autoperfundidas "in situ" .....	9
- Preparaciones renales mecánicas "asistidas" .....	1
- Otro tipo de preparaciones ( útero, útero grávido, intestino delgado, bazo, páncreas, cerebro ) .....	<u>22</u>
TOTAL .....	92

Tabla IV.

Nº Exp.	Fecha	OBSERVACIONES
01	21-VI-72	Preparación técnica
02	28-VI-72	Preparación técnica
03	11-VII-72	Se administró Acetato marcado + cAMP
04	18-VI-72	Preparación técnica
05	28-VII-72	Preparación cardiopulmonar autoperfundida Tiempo de Supervivencia de la Preparación (T.S.P.): 250 minutos
06	9-X-72	Preparación cardiopulmonar autoperfundida (T.S.P.): 185 minutos
07	16-X-72	Preparación cardiopulmonar autoperfundida Acetato* (T.S.P.): 100 minutos
08	6-XI-72	Preparación cardiopulmonar autoperfundida (T.S.P.): 95 minutos
09	13-XI-72	Preparación cardiopulmonar autoperfundida Acetato* (T.S.P.): 125 minutos
10	13-XI-72	Control Acetato* No se hizo preparación
11	27-XI-72	Preparación cardiopulmonar autoperfundida (T.S.P.): 230 minutos
12	4-XII-72	Preparación cardiopulmonar autoperfundida Acetato* (T.S.P.): 210 minutos
13	11-XII-72	Preparación cardiopulmonar autoperfundida (T.S.P.): 185 minutos
14	18-XII-72	Preparación cardiopulmonar autoperfundida (T.S.P.): 200 minutos
15	29-XII-72	Preparación cardiopulmonar autoperfundida (T.S.P.): 70 minutos
16	29-XII-72	Preparación cardiopulmonar autoperfundida Acetato* (T.S.P.): 255 minutos
17	8-I-73	Preparación cardiopulmonar autoperfundida (T.S.P.): 115 minutos
18	22-I-73	Se comienza a utilizar extracorpórea Se perfunde pulmón - corazón SIN OXIGENADOR
19	29-II-73	Se perfunde hígado aislado con extracorpórea CON OXIGENADOR
20	5-II-73	Se perfunde hígado aislado con extracorpórea SIN OXIGENADOR
21	12-II-73	Se perfunde pulmón - corazón con extracorpórea SIN OXIGENADOR; se empleó calentador y se adoptó longitud definitiva de los tubos de conexión
22	26-II-73	Perfusión pulmonar Corazón parado; Bombeo: 120 minutos + Palmitato C <sup>14</sup>
23	5-III-73	Se ensayó válvula de respirador autorregulable (T.S.P.): 120 minutos

Tabla IV.

Nº Exp.	Fecha	OBSERVACIONES
24	9-III-73	Perfusión pulmonar: 110 minutos (autoperfundida) los últimos 15 minutos con bomba (T.S.P.): 125 minutos
25	12-III-73	Cateterismo coledoco; Introducción por la porta de ST4*; Recogida fraccionada de bilis durante 75 minutos; Preparación intestino delgado +hígado
26	20-III-73	Preparación cardiopulmonar autoperfundida control
27	25-III-73	Cateterismo coledoco; Cateterismo conducto torácico; Punciones repetidas control sangre portal; Cortisol* en la luz intestinal con 1 m. de Asa; (T.S.P.): 120 minutos
28	7-IV-73	Preparación hepática autoperfundida
29	20-IV-73	Preparación hepática autoperfundida
30	8-V-73	Preparación hepática autoperfundida
31	20-V-73	Preparación cardiopulmonar autoperfundida -Acetato*
32	26-V-73	Preparación cardiopulmonar autoperfundida (T.S.P.): 180 minutos
33	4-VI-73	Preparación renal autoperfundida (T.S.P.): 180 minutos
34	13-VI-73	Preparación renal autoperfundida (T.S.P.): 40 minutos
35	1-VII-73	Preparación uterina autoperfundida (T.S.P.): 35 minutos
36	16-VII-73	Preparación uterina autoperfundida (T.S.P.): 25 minutos
37	28-IX-73	Preparación uterina autoperfundida (T.S.P.): 180 minutos
38	3-X-73	Preparación uterina sobre útero-gravido (4 meses) autoperfundida (T.S.P.): 150 minutos
39	20-X-73	Preparación hepática + intestinal autoperfundida (T.S.P.): 44 minutos
40	24-X-73	Preparación intestinal autoperfundida (T.S.P.): 240 minutos
41	25-X-73	Preparación cardiopulmonar autoperfundida (T.S.P.): 180 minutos
42	2-XI-73	Preparación hepática autoperfundida (T.S.P.): 180 minutos
43	6-XI-73	Preparación intestinal autoperfundida (T.S.P.): 180 minutos
44	25-XI-73	Preparación renal autoperfundida (T.S.P.): 240 minutos
45	12-XII-73	Preparación renal autoperfundida (T.S.P.): 240 minutos
46	18-I-74	Preparación hepática autoperfundida (T.S.P.): 240 minutos

Tabla IV.

Nº Exp.	Fecha	OBSERVACIONES
47	28-I-74	Preparación hepática autoperfundida ( T.S.P. ): 240 minutos
48	10-II-74	Preparación cardiopulmonar autoperfundida ( T.S.P. ): 360 minutos
49	18-II-74	Preparación cardiopulmonar autoperfundida ( T.S.P. ): 360 minutos
50	5-III-74	Preparación cardiopulmonar autoperfundida ( T.S.P. ): 240 minutos
51	18-III-74	Preparación cardiopulmonar autoperfundida Acetato* + Palmitato* ( T.S.P. ): 180 minutos
52	27-III-74	Preparación cardiopulmonar autoperfundida
53	5-IV-74	Preparación uterina sobre útero - grávido ( 3 meses ) ( T.S.P. ): 180 minutos
54	6-IV-74	Preparación uterina sobre útero - grávido ( 3,5 meses ) ( T.S.P. ): 180 minutos
55	22-IV-74	Preparación hepática autoperfundida ( T.S.P. ): 180 minutos
56	15-V-74	Preparación hepática + renal autoperfundida
57	10-VI-74	Preparación hepática + renal autoperfundida ( T.S.P. ): 60 minutos
58	25-VI-74	Preparación hepática + renal autoperfundida ( T.S.P. ): 180 minutos
59	2-VII-74	Preparación hepática + renal autoperfundida ( T.S.P. ): 180 minutos
60	4-VII-74	Preparación hepática + renal autoperfundida ( T.S.P. ): 180 minutos
61	10-X-74	Preparación cardiopulmonar autoperfundida Acetato* + Palmitato* ( T.S.P. ): 160 minutos
62	23-X-74	Preparación cardiopulmonar autoperfundida ( T.S.P. ): 360 minutos
63	1-XI-74	Preparación cardiopulmonar - hepática autoperfundida ( T.S.P. ): 20 minutos
64	13-XI-74	Preparación cardiopulmonar - hepática ( T.S.P. ): 15 minutos
65	26-XI-74	Preparación cardiopulmonar - hepática ( T.S.P. ): 0 minutos
66	3-XII-74	Preparación cardiopulmonar - hepática ( T.S.P. ): 50 minutos
67	26-XII-74	Preparación cardiopulmonar - hepática ( T.S.P. ): 90 minutos
68	12-I-75	Preparación cardiopulmonar - hepática ( T.S.P. ): 120 minutos
69	30-I-75	Preparación cardiopulmonar - hepática ( T.S.P. ): 180 minutos



Tabla IV.

Nº Exp	Fecha	OBSERVACIONES
70	6-II-75	Preparación cardiopulmonar - hepática ( T.S.P. ): 240 minutos
71	7-III-75	Preparación cardiopulmonar autoperfundida ( T.S.P. ): 240 minutos
72	10-III-75	Preparación cardiopulmonar autoperfundida ( T.S.P. ): 240 minutos
73	28-III-75	Preparación hepato - renal autoperfundida ( T.S.P. ): 120 minutos
74	7-IV-75	Preparación uterina sobre útero - grávido ( 3 meses ) ( T.S.P. ): 240 minutos
75	21-IV-75	Preparación uterina sobre útero - grávido ( 4 meses ) ( T.S.P. ): 240 minutos
76	10-V-75	Preparación uterina sobre útero - grávido ( 4 meses ) ( T.S.P. ): 360 minutos
77	2-VI-75	Preparación cardiopulmonar autoperfundida ( T.S.P. ): 240 minutos
78	3-VII-75	Preparación cardiopulmonar autoperfundida ( T.S.P. ): 240 minutos
79	10-X-75	Preparación cardiopulmonar Acetato* + Palmitato* ( T.S.P. ): 30 minutos
80	30-X-75	Preparación cardiopulmonar autoperfundida ( T.S.P. ): 120 minutos
81	4-XI-75	Preparación hepato - renal autoperfundida ( T.S.P. ): 180 minutos
82	17-XI-75	Preparación cardiopulmo - renal autoperfundida ( T.S.P. ): 180 minutos
83	30-XI-75	Preparación cardiopulmo - renal autoperfundida ( T.S.P. ): 120 minutos
84	10-XII-75	Preparación cardiopulmo - renal autoperfundida ( T.S.P. ): 180 minutos
85	29-XII-75	Preparación cardiopulmo - renal autoperfundida ( T.S.P. ): 240 minutos
86	15-I-76	Preparación cardiopulmonar autoperfundida ( T.S.P. ): 480 minutos
87	2-II-76	Neumectomía
88	8-III-76	Control cardiopulmonar autoperfundido ( T.S.P. ): 120 minutos
89	4-IV-76	Control cardiopulmonar hepático autoperfundido ( T.S.P. ): 120 minutos
90	16-IV-76	Control cardiopulmo - renal autoperfundido ( T.S.P. ): 120 minutos
91	20-V-76	Control cardiopulmo - intestino delgado - páncreas - bajo autoperfundido ( T.S.P. ): 120 minutos
92	15-XII-76	Control cardiopulmo - cerebral ( T.S.P. ): 30 minutos

## RESULTADOS

#### PREPARACION CARDIO-PULMONAR

Junto a una estructura cardíaca que se conserva íntegramente dentro de los límites de la normalidad y a lo largo de toda la experiencia, (Fig.37) el examen estructural del parénquima pulmonar, se nos muestra a los 15 minutos de perfusión, en toda su integridad, con preservación de la luz tanto de bronquios y bronquiolos, como con un epitelio sin posibilidad de demostrar ningún tipo de alteración (Fig.38), mostrando los espacios alveolares igualmente normales, tanto en tamaño como en conformación, evidentes a microscopía óptica (Figs. 39) y electrónica (Fig.43) tanto los septos como los alveolos se muestran en biopsias tomadas a los 30 y 60 minutos de perfusión dentro de los límites de la normalidad, pudiendo observarse cuerpos intracitoplasmáticos con depósito de material lipídico (Fig.39) A partir de los 90 minutos aparecen áreas dispersas con discretas atelectasias y vasodilatación septal, que alternan con áreas de normalidad y que nos permiten inferir que expresan un estadio de transición hacia un edema intersticial e intraalveolar de comienzo (Fig.41). En las últimas muestras, tomadas a partir de los 120 minutos de perfusión se aprecia como única alteración un discreto edema intraalveolar (Fig.42), demostrable tanto a microscopía óptica como electrónica (Fig.47).

En la Tabla V recogemos el tiempo de duración en minutos de las preparaciones cardio-pulmonares con especificación de cada una de ellas. Las 37 experiencias recogidas sobrepasan los 90 minutos considerados como tiempo útil para el correcto funcionamiento de la preparación. La preparación que figura con 70 minutos estuvo dedicada exclusivamente a la realización técnica del diseño y se suspendió volun

Tabla V

<u>TIEMPO DE DURACION EN MINUTOS DE LAS PREPARACIONES CARDIO-PULMONARES</u>		
<u>Tiempo (min.)</u>	<u>Nº de preparaciones</u>	<u>Tipo de preparación</u>
70 .....	1 .....	cardio-pulmonar autoperfundida
95 .....	1 .....	"in situ"
100 .....	1 .....	"
115 .....	1 .....	"
120 .....	3 .....	"
125 .....	1 .....	"
160 .....	1 .....	"
180 .....	3 .....	"
185 .....	2 .....	"
200 .....	1 .....	"
210 .....	1 .....	"
230 .....	1 .....	"
240 .....	5 .....	"
250 .....	1 .....	"
255 .....	1 .....	"
360 .....	2 .....	"
480 .....	1 .....	"
No alcanzaron los 20 min. .	5 .....	"
30 .....	1 .....	cardio-pulmonar autoperfundida
		"aislada"
120 .....	4 .....	cardio-pulmonar mecánica
		"asistida"
TOTAL .....	37	

tariamente pasado dicho tiempo.

Las Tablas VI y VII hacen un resumen del control secuencial verificado sobre las alteraciones tanto estructurales como ultraestructurales. En el primer caso las imágenes ofrecidas han sido realizadas con tinción por el método de hematosilina-eosina y corresponden a 200 aumentos.

La microscopía electrónica realizada igualmente sobre preparaciones cardíacas y pulmonares corresponden a piezas teñidas con hematoxilina-eosina y fotografiada con aumento de 39.000 por campo.

Junto a este patrón morfológico existe una función igualmente normal, tanto con respecto a los parámetros hemodinámicos controlados (Fig.36) como en cuanto a los parámetros guía de la función pulmonar ( $PO_2$  y  $PCO_2$ ), así como otras constantes igualmente controladas (Fig.48). Ambas gráficas recogen los tiempos medios (3 horas) de funcionamiento "normal" de las preparaciones. Como hemos indicado las constantes controladas se encuentran dentro de los límites fisiológicos, aunque los valores de  $PCO_2$ , glucosa y potasio, merecen comentario aparte. En el caso del potasio, en la experiencia recogida con el n°15, se registró una marcada hipopotasemia, señalada ya a los 30 minutos y que alcanza cifras de 20 mEq/L. a los 65 minutos, sin embargo esta preparación que dejó de funcionar a los 70 minutos y a la que nos hemos referido anteriormente, no consideramos que deba dársele valor estadístico puesto que como dijimos anteriormente correspondió a una preparación meramente técnica.

Posteriormente hemos encontrado caídas progresivas tanto en los valores del hematocrito como del sodio y del

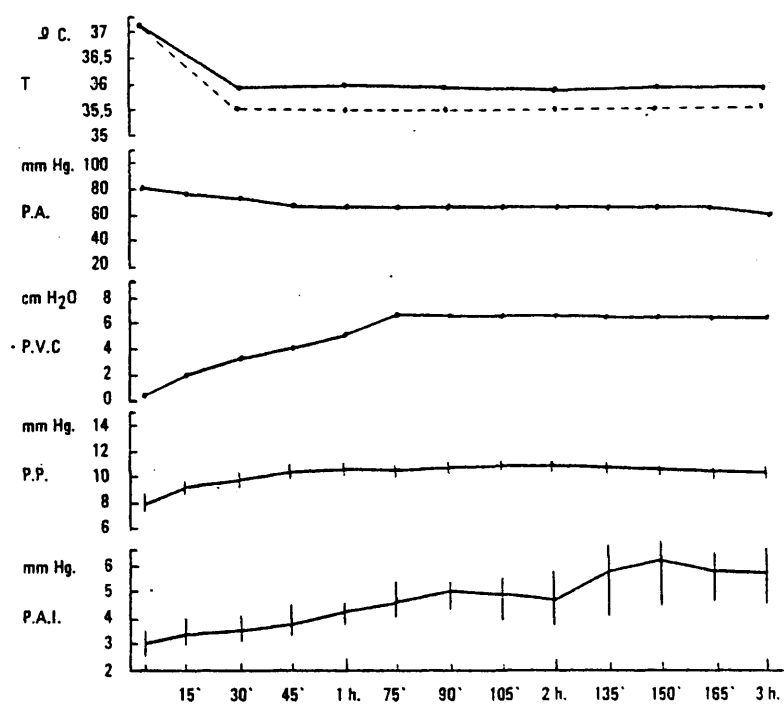


Fig. 36 Parámetros de control hemodinámico efectuados, sistemáticamente, durante el desarrollo de las perfusiones cardio-pulmonares. T: temperaturas; P.A.: presión registrada en la línea arterial; P.V.C.: presión recogida en la aurícula derecha; P.P.: presión registrada en la arteria pulmonar; P.A.I.: presión en la aurícula izquierda.

Tabla VI

**CONTROL SECUENCIAL DE LAS ALTERACIONES**  
**ESTRUCTURALES CARDIO-PULMONARES**

- a.- Estructura cardíaca: normal a lo largo de toda la experiencia; a los 120 min. hay un intersticio sin proliferación fibrosa, ni infiltración inflamatoria o lesiones vasculares. Las células miocárdicas no presentan alteraciones, ni se evidencian lesiones necrosantes.
- b.- Estructura pulmonar obtenida por biopsias sucesivas a los siguientes tiempos:
- 15 minutos: Estructura normal, epitelio sin alteraciones; espacios alveolares normales en forma y tamaño.
- 30 minutos: Sin variaciones estructurales.
- 70 minutos: Cuerpos intracitoplasmáticos con depósito de material lipídico
- 90 minutos: Áreas dispersas con discretas atelectasias y vasodilatación septal alternando con áreas de normalidad.
- 100 minutos: Neumocito II, mostrando cuerpos lamelares en diferentes fases evolutivas.
- 110 minutos: Acúmulo de cuerpos lamelares vacíos.
- 120 minutos: Edema intra-alveolar

Tabla VII

**CONTROL SECUENCIAL DE LAS ALTERACIONES**  
**ULTRA-ESTRUCTURALES CARDIO-PULMONARES**

**Microscopia electrónica H.E. x 39.000**

a.- **Ultra-estructura cardíaca:** Normal a lo largo de toda la experiencia (150 min.)  
sin alteraciones inflamatorias o lesiones de necrosis.

b.- **Ultra-estructura pulmonar:** Obtenida por biopsias sucesivas a los siguientes  
tiempos:

**60 minutos:** Aspecto normal de neumocitos tipo II, superficie y espacios  
alveolares libres.

**70 minutos:** Neumocitos tipo II normales; espacios y superficies alveolares  
libres; cuerpos lamelares en diferentes fases evolutivas.

**110 minutos:** Acúmulo de cuerpos lamelares vacíos.

**150 minutos:** Acúmulo de material proteico en los espacios alveolares.



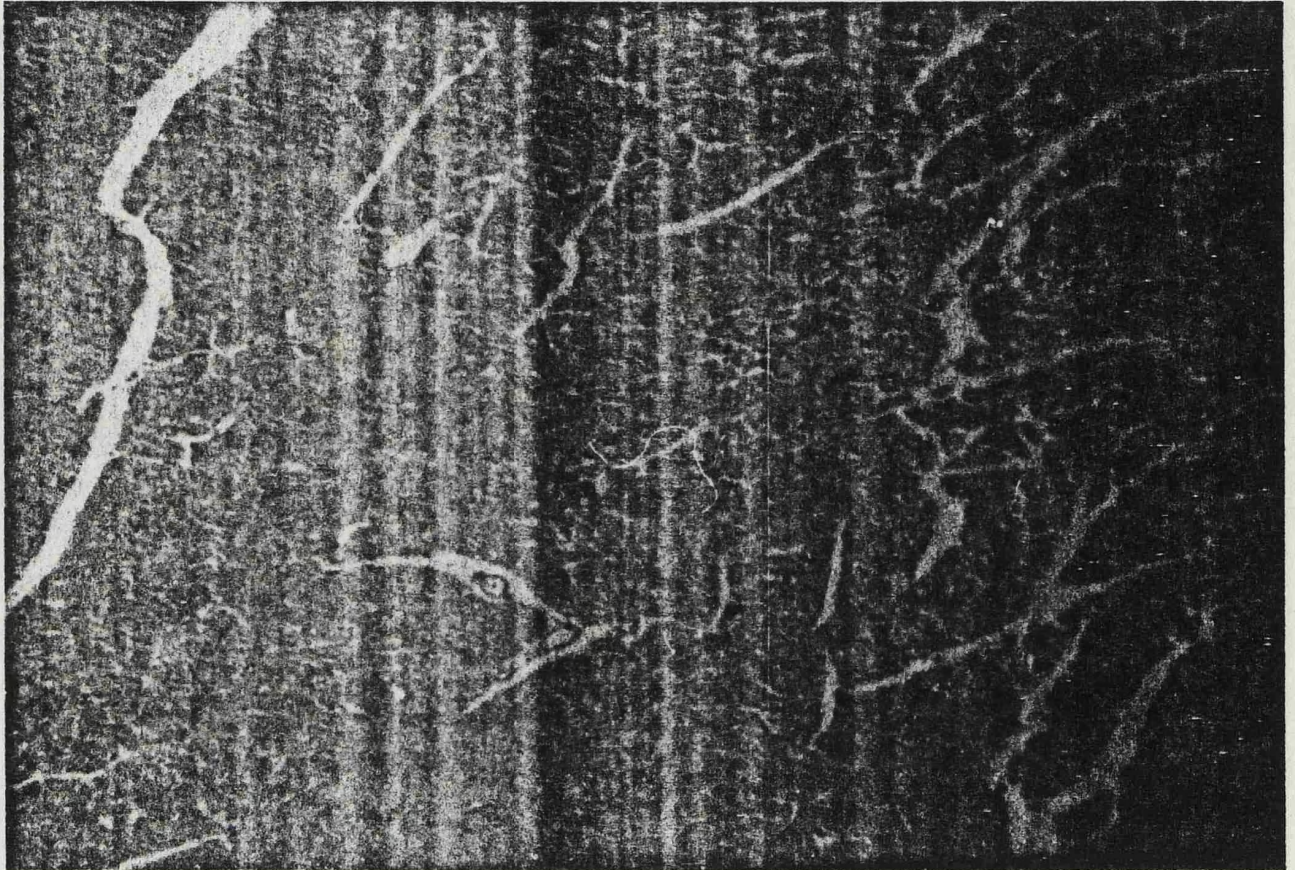


Fig. 37 Miocardio (100 min.). Se observa un intersticio sin proliferación fibrosa, ni infiltración inflamatoria o lesiones vasculares. Las células miocárdicas no presentan alteración alguna, no existiendo lesiones de tipo necrosante (H.E. x 200).





Fig. 38 Parénquima pulmonar (15 min.). Integridad morfológica con preservación de la luz, tanto bronquial como bronquiolar. Epitelio sin alteraciones demostrables.



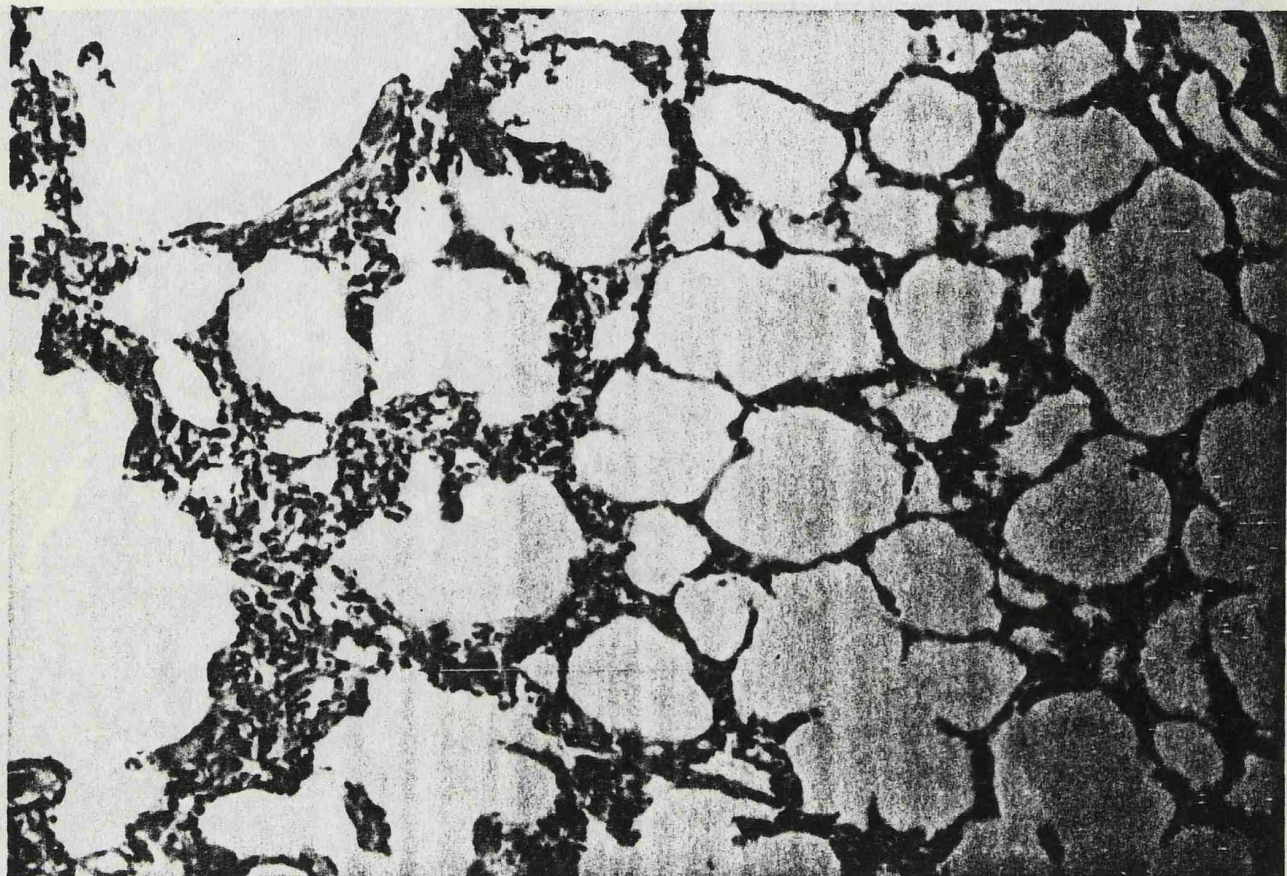


Fig. 39 Parénquima pulmonar (60 min). Espacios alveolares normales.



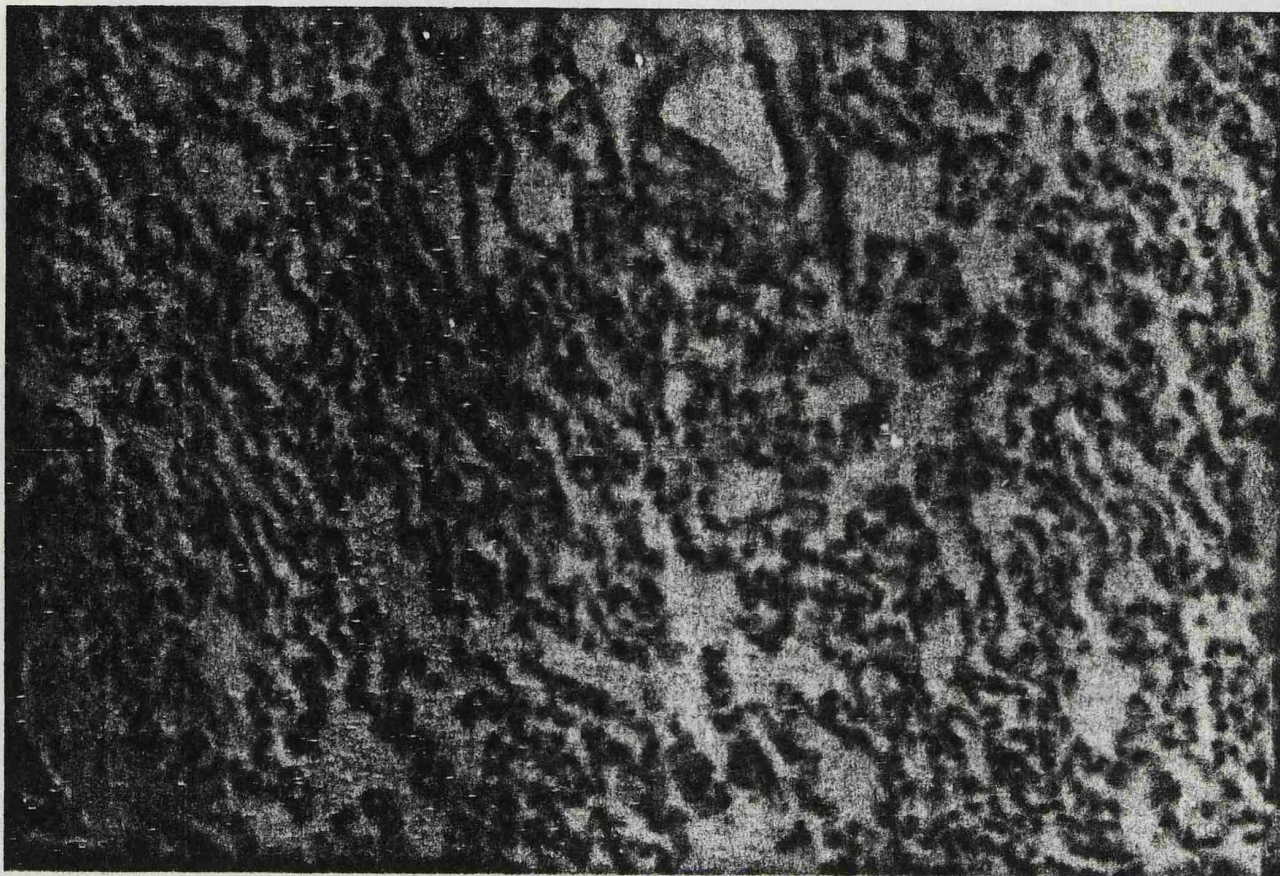


Fig . 40 Parénquima pulmonar (115 min.). Espacios alveolares normales.





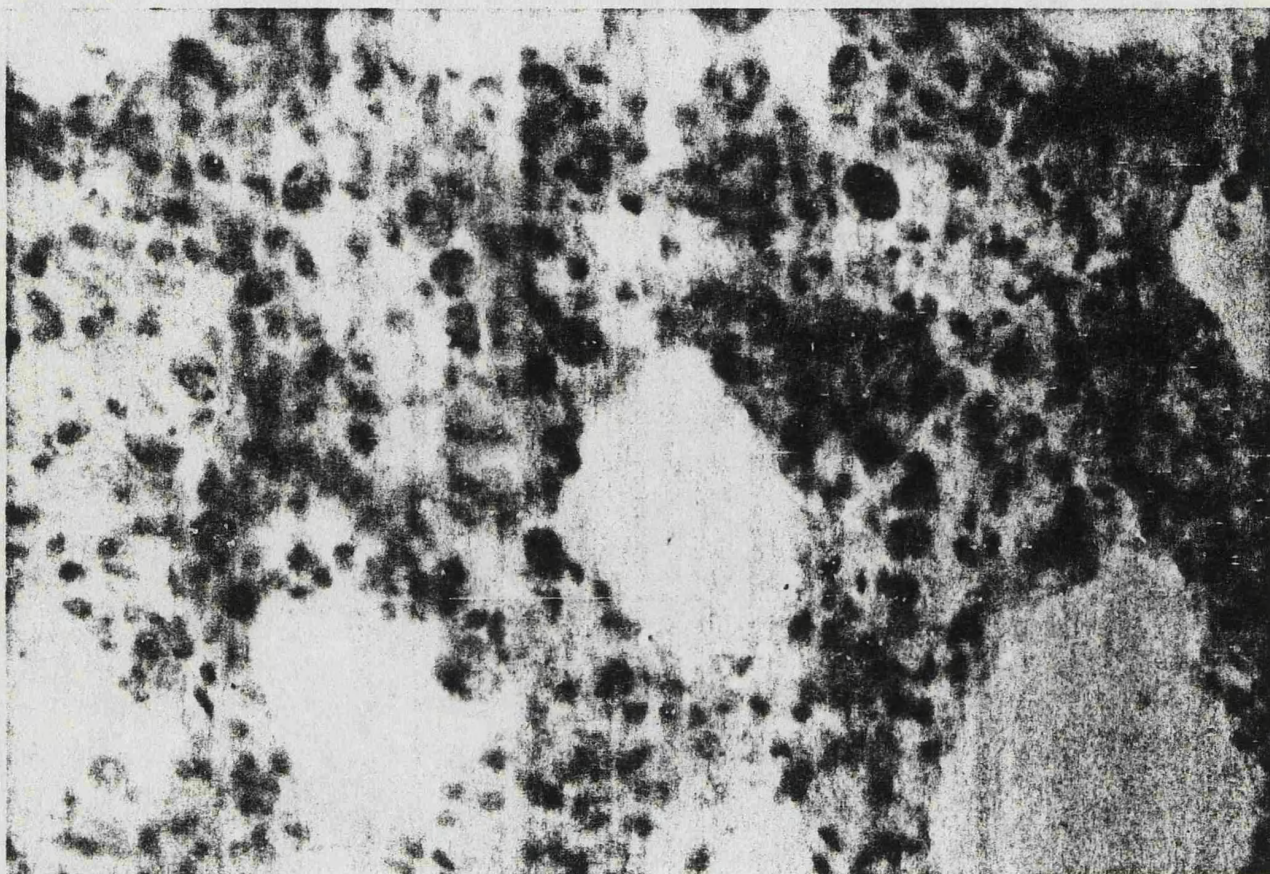


Fig. 41 Parénquima pulmonar (100 min.). Edema intersticial.



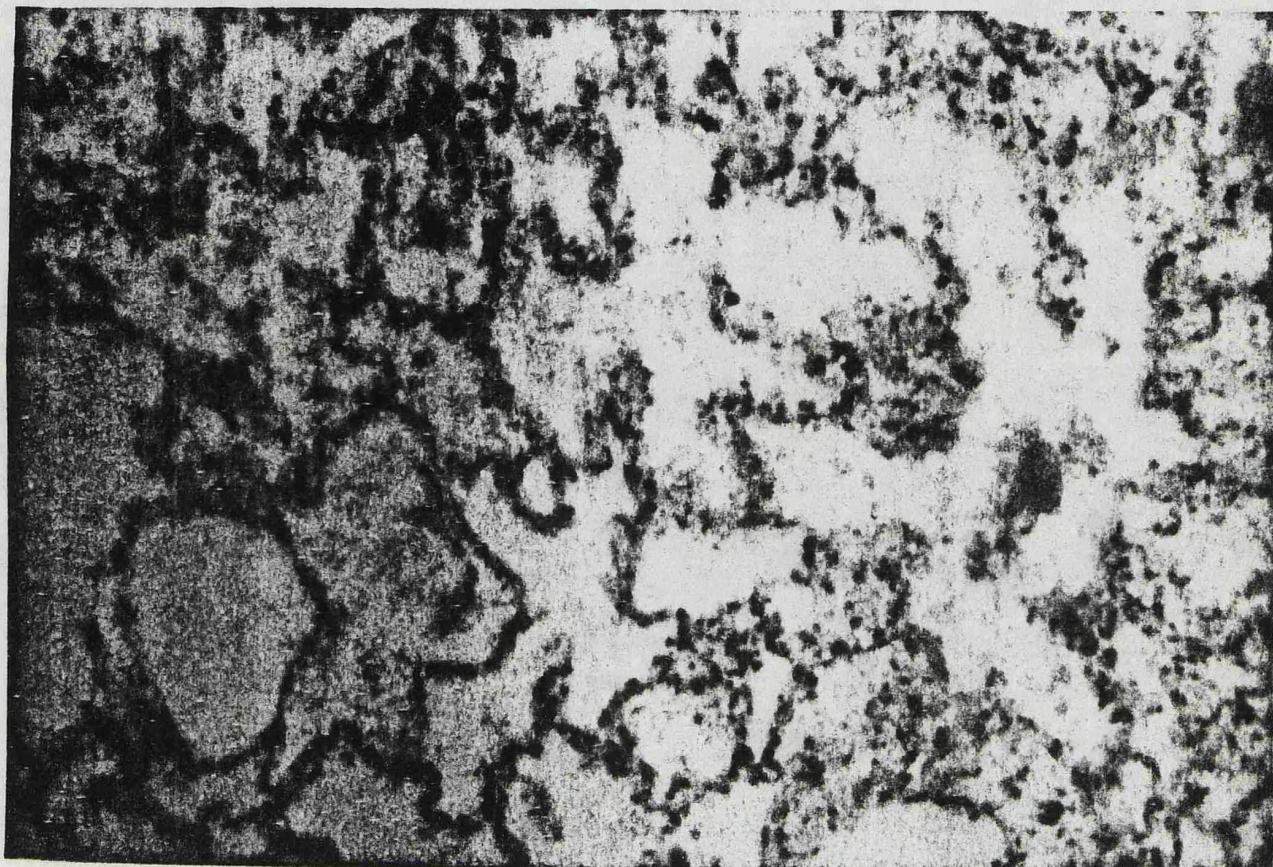


Fig. 42 Parénquima pulmonar (150 min.). Edema intra-alveolar.



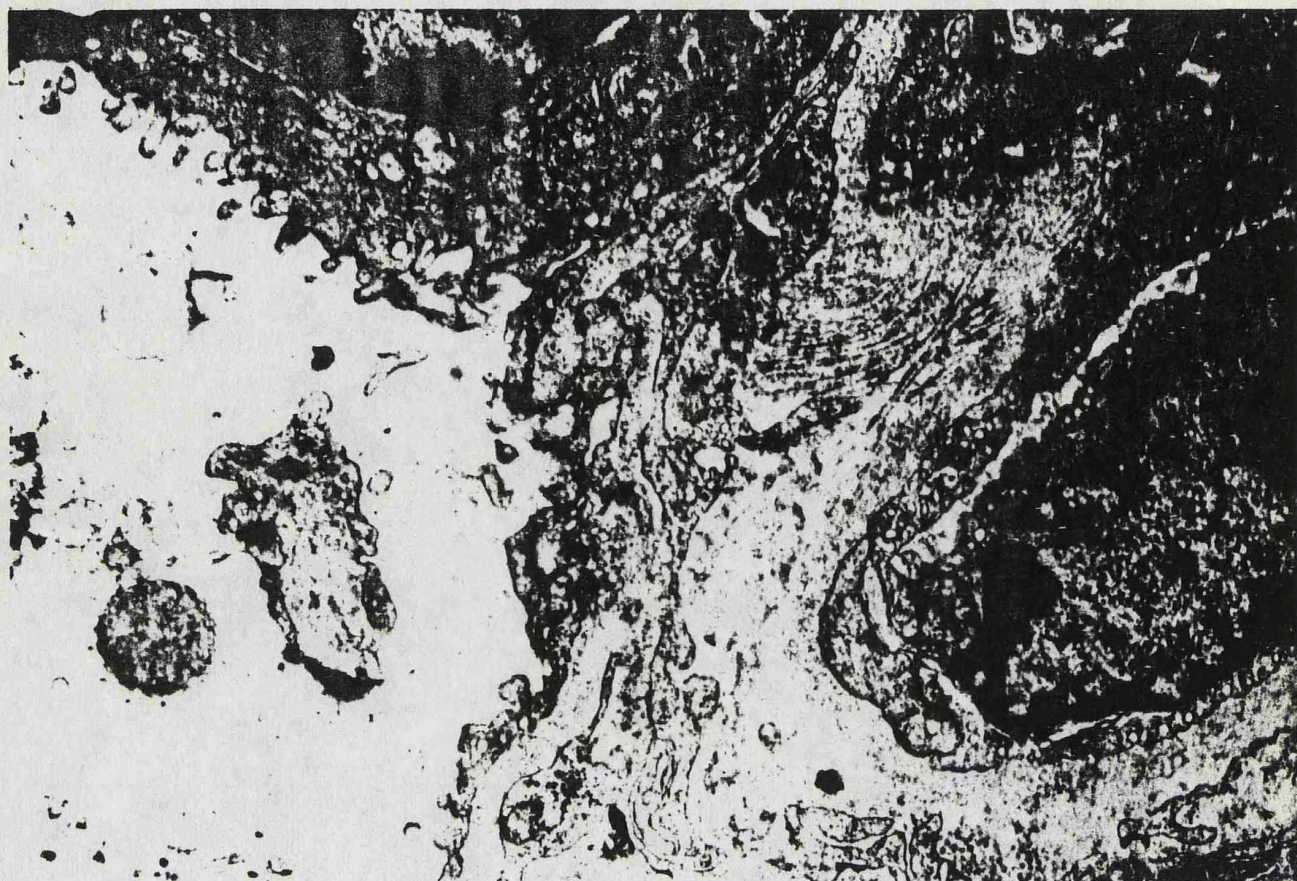


Fig. 43 Parénquima pulmonar (60 min.). Microscopía electrónica. Aspecto normal de neumocitos tipo II; superficie alveolar y espacio alveolar libres.



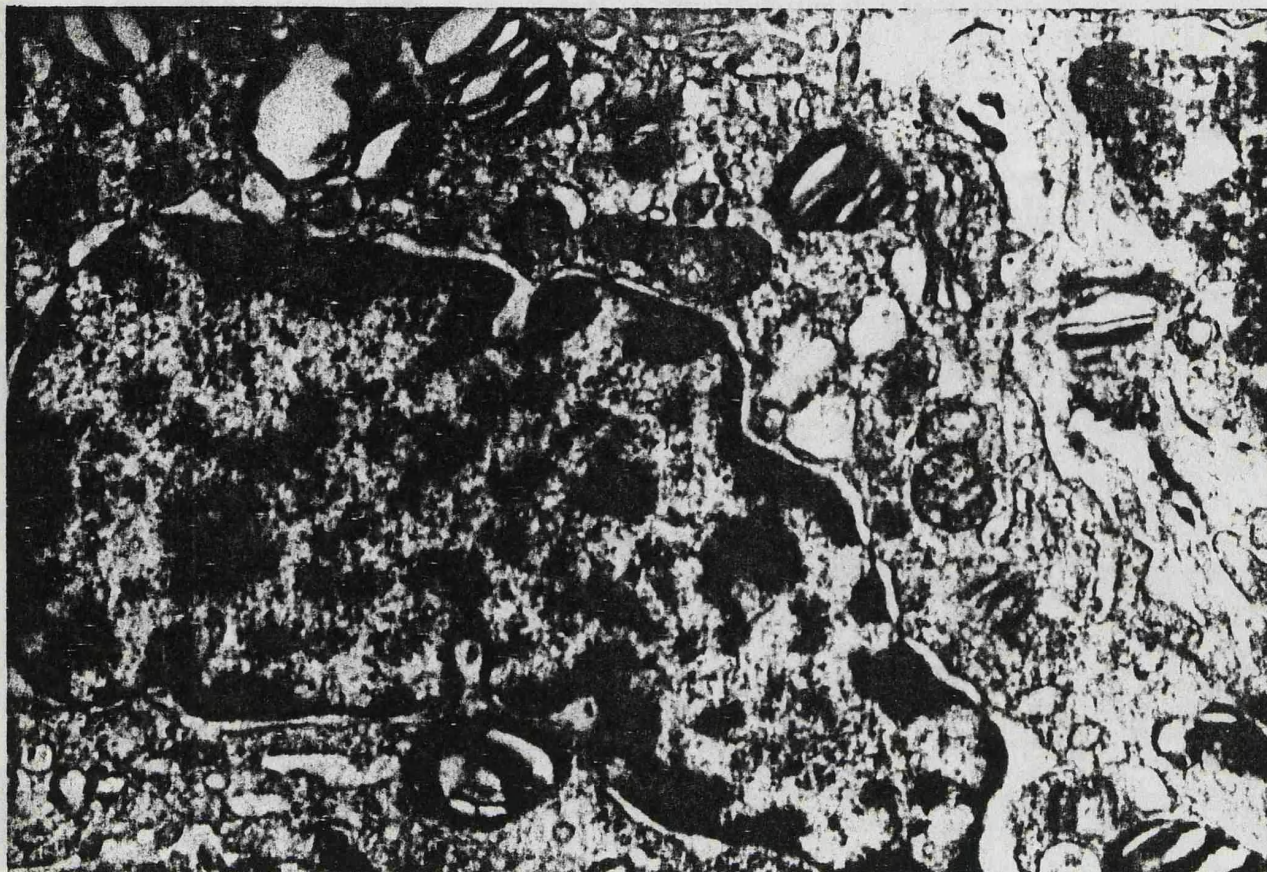


Fig. 44 Parénquima pulmonar (70 min.). Microscopía electrónica. Aspecto normal de un neumocito tipo II. Cuerpos lamelares en diferentes fases evolutivas.



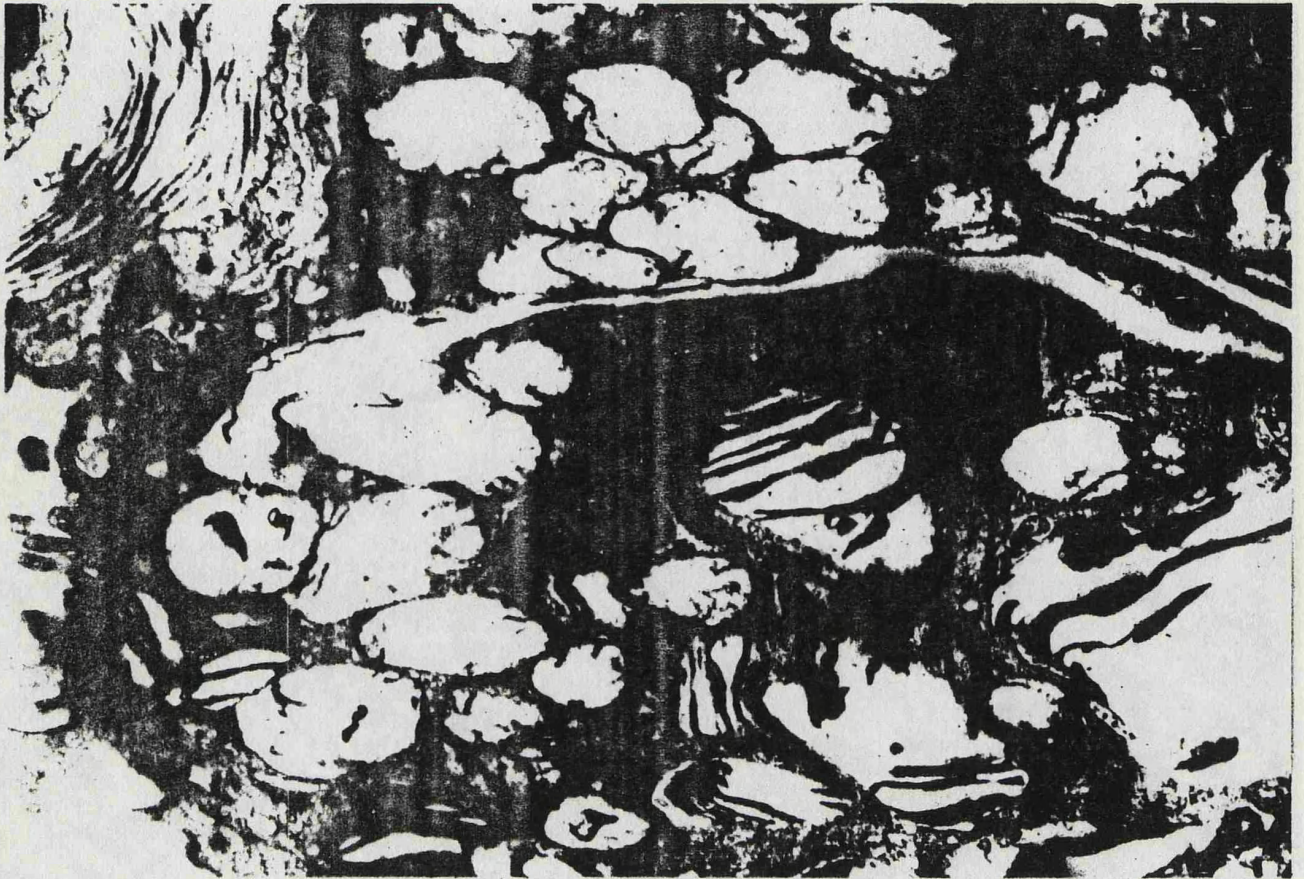


Fig. 45 Parénquima pulmonar (100 min.). Microscopía electrónica (x 39.000). Neumocito tipo II mostrando cuerpos lamelares en diferentes fases evolutivas.



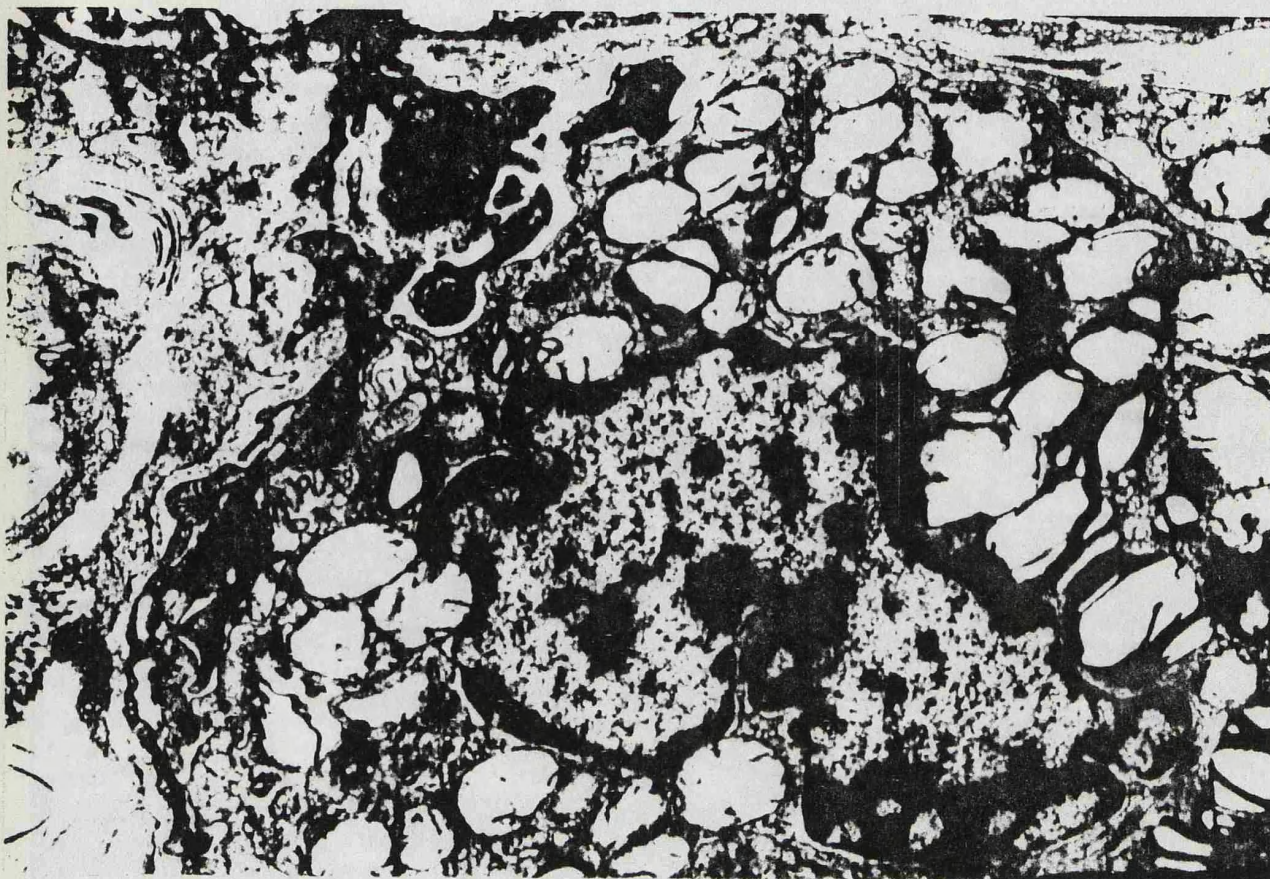


Fig. 46 Parénquima pulmonar. Microscopía electrónica  
(x 39.000) tomada a los 110 min. de perfusión.  
Acúmulo de cuerpos lamelares "vacíos".





Fig. 47 Parénquima pulmonar (150 min.). Microscopía electrónica. Acúmulo de material proteináceo en el espacio alveolar.

potasio plasmáticos, aunque creemos que se debían a los efectos eventuales de la dilución producida por la adición de suero destinado a mantener en niveles óptimos el volumen del reservorio.

Los niveles de glucosa se han mantenido por encima de la normalidad. Estos niveles se logran por el hecho de que en condiciones de hiperglicemia, existe una elevación significativa del coeficiente respiratorio pulmonar, indicando una conversión de carbohidratos a grasa en el pulmón (Weber y Visscher-1969), que explica un incremento en el rendimiento de la lipogénesis de "novo", cuando se añade glucosa al medio (Salisbury-Murphy y cols. 1966), hecho a tener en cuenta puesto que algunas preparaciones fueron utilizadas como modelos en biosíntesis lipídica pulmonar (Acebal y cols. 1977).

Los valores de  $PCO_2$  son más difíciles de controlar, debido por un lado a que la producción de  $CO_2$  por parte del pulmón es muy pequeña (2,24 ml./minuto-Weber-Visscher 1969) y por otro a que la ventilación, al pretender ser "fisiológica", produce una hiperventilación forzada que obliga a emplear una mezcla de aire/ $CO_2$  = 95/5. Los valores de  $PO_2$  se mantuvieron en todo momento superiores a 85 ml. de Hg. Las supervivencias de las preparaciones en las condiciones fisiológicas descritas oscilaron de 95 y 255 minutos siendo el tiempo medio de funcionamiento "normal" de 185 minutos.

Junto a los hechos morfofuncionales descritos, el comportamiento bioquímico del pulmón es igualmente normal, reflejado en una biosíntesis lipídica correcta. La función fisiológica de intercambio gaseoso por parte del pulmón, des



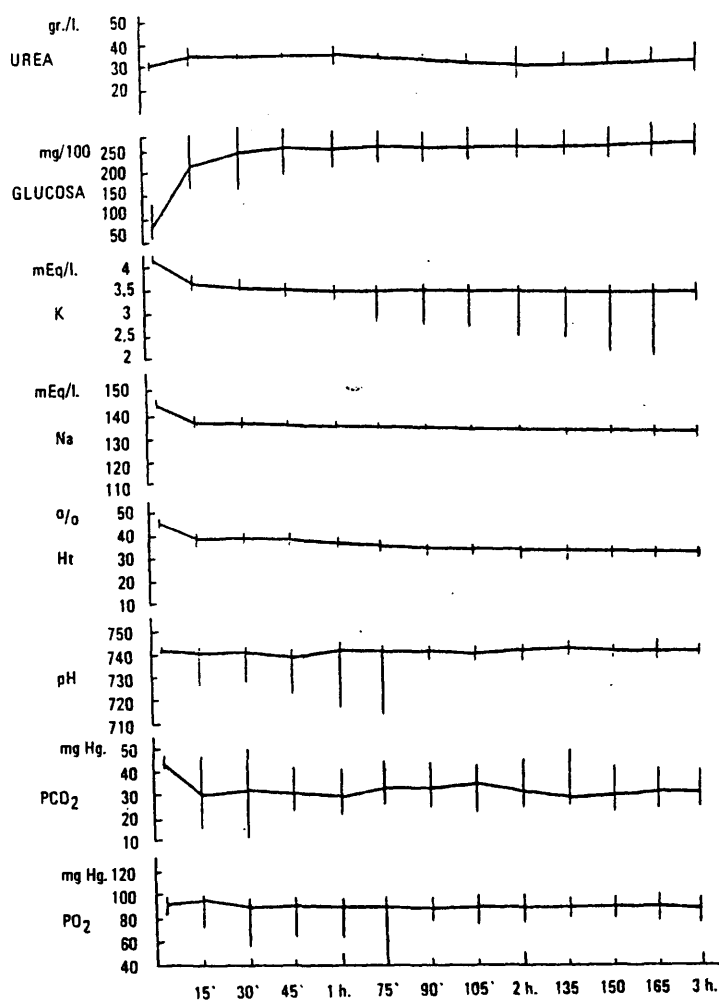


Fig. 48 Controles bioquímicos efectuados, sistemá-  
ticamente, durante el desarrollo de las -  
experiencias con preparaciones cardio-pul-  
monares aisladas perfundidas.

causa en la producción de un fosfolípido específico a expensas de los neumocitos alveolares tipo II. Tal fosfolípido, la fosfatidil-colina, disaturada con ácido palmítico (lecitina) tiene la particularidad de presentar propiedades tensioactivas, representando el componente fundamental del denominado surfactante pulmonar, que cumple la misión de mantener abiertos los espacios alveolares. Junto a la lecitina, la porción apoproteínica correspondiente y determinados glúcidos, completan la composición de dicho surfactante. En resumen, el hecho de que el pulmón pueda desempeñar su función respiratoria depende enteramente de su normal metabolismo que no es más que la expresión de una biosíntesis correcta del material surfactante-lecitina.

Las Figs. 49, 50, 51, y 52 muestran el proceso tanto de incorporación de precursores en la fracción lipídica total pulmonar, como la biosíntesis de los diferentes fosfolípidos pulmonares.

La Fig. 49 recoge la relación entre la desaparición de ácidos grasos marcados en el plasma y su incorporación tanto en ácidos grasos del parénquima pulmonar como del material surfactante, representándose en la Fig. 50 la incorporación de la fracción fosfolipídica pulmonar en dicho surfactante; la Fig. 51 muestra la incorporación de material radiactivo en las diferentes fracciones lipídicas a nivel del parénquima pulmonar: Colesterol, triglicéridos, ácidos grasos libres y fosfolípidos. En esta gráfica puede apreciarse una incorporación en "picos".

El hecho apuntado de un tipo de incorporación discontinua se aclara en la Fig. 52 en la que se representa la secuencia correspondiente a la biosíntesis de los distintos

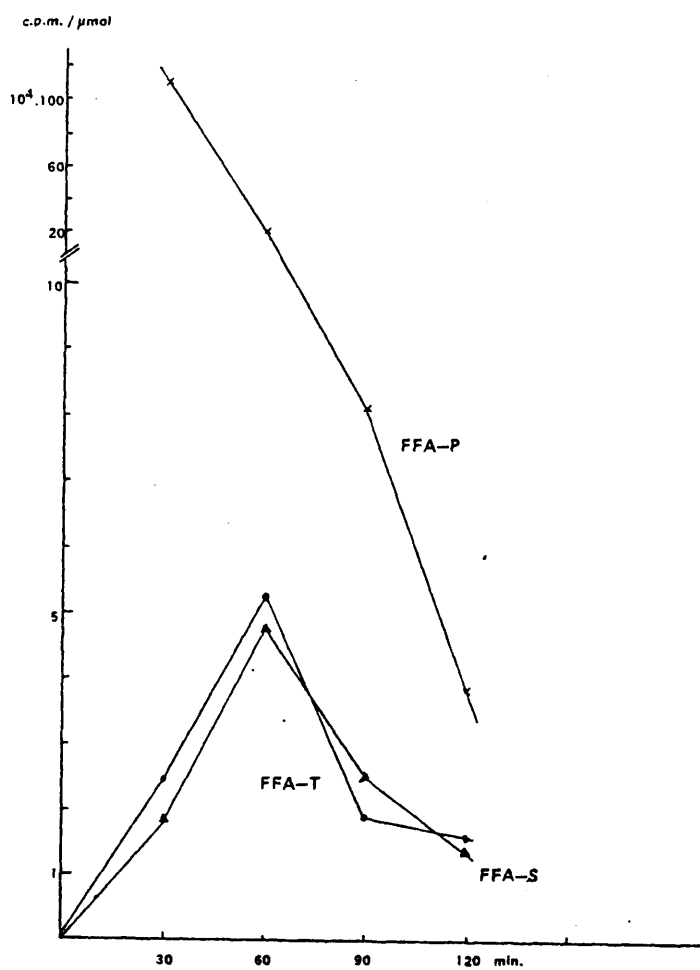


Fig. 49 Incorporación de precursores marcados: (H<sup>3</sup>) palmitato, en la fracción de ácidos grasos libres (FFA), en plasma (P); pulmón (P) y surfactante (S).

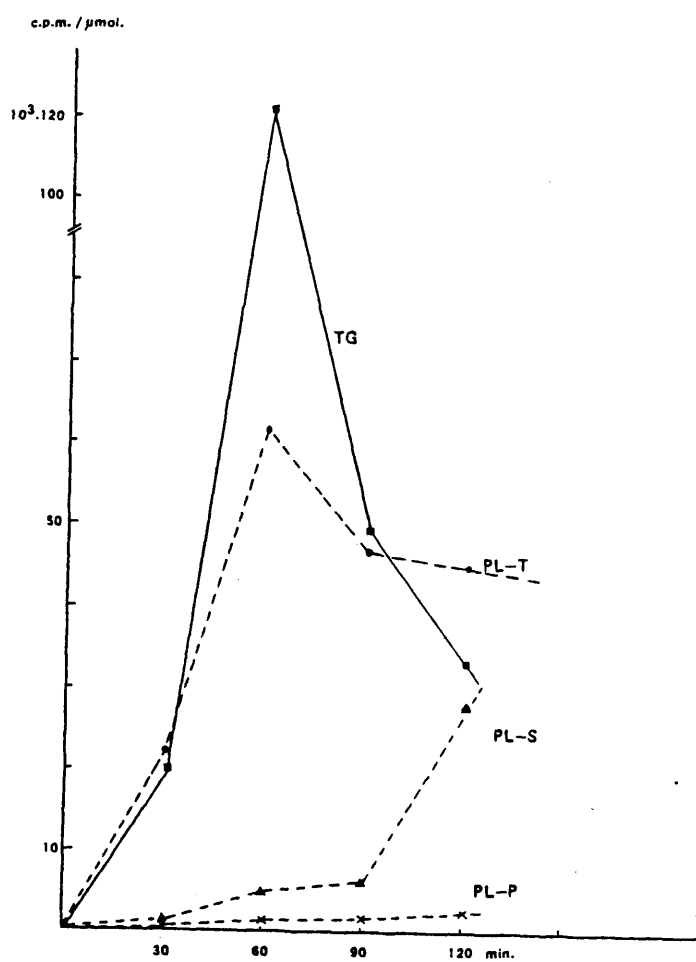


Fig. 50 Incorporación de ácido (H<sup>3</sup>) palmítico, en tri-  
glicéridos pulmonares (TG) y en la fracción  
fosfolipídica (PL) de plasma (P); pulmón (T)  
y surfactante (S).

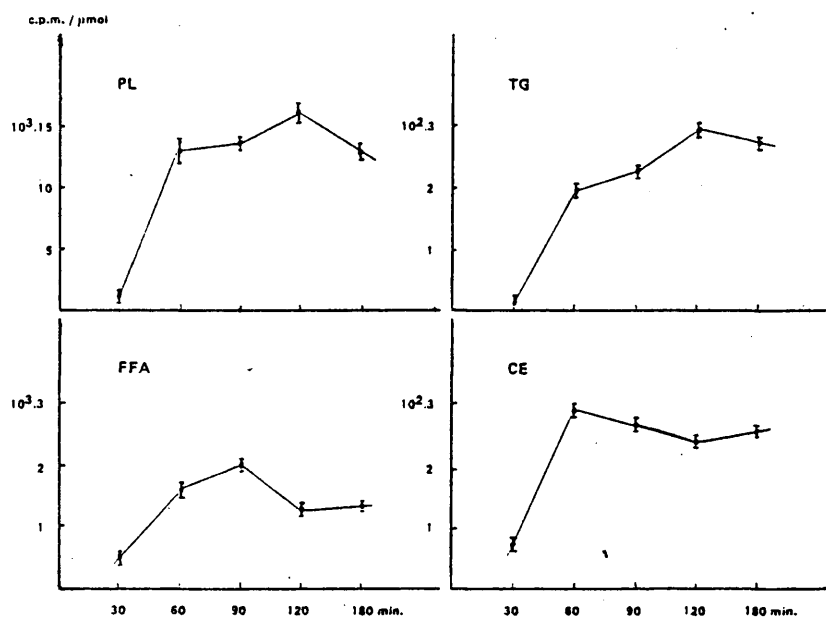


Fig. 51 Incorporación de ácido  $(H^3)$  palmítico, en diferentes fracciones lipídicas pulmonares: PL, fosfolípidos totales, TG, triglicéridos; FFA, ácidos grasos libres y CE, colesterol esterificado.



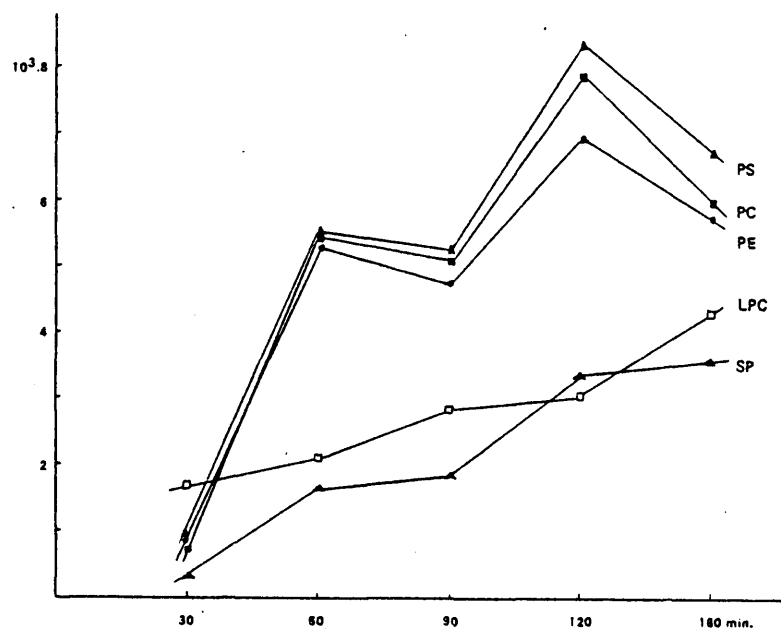


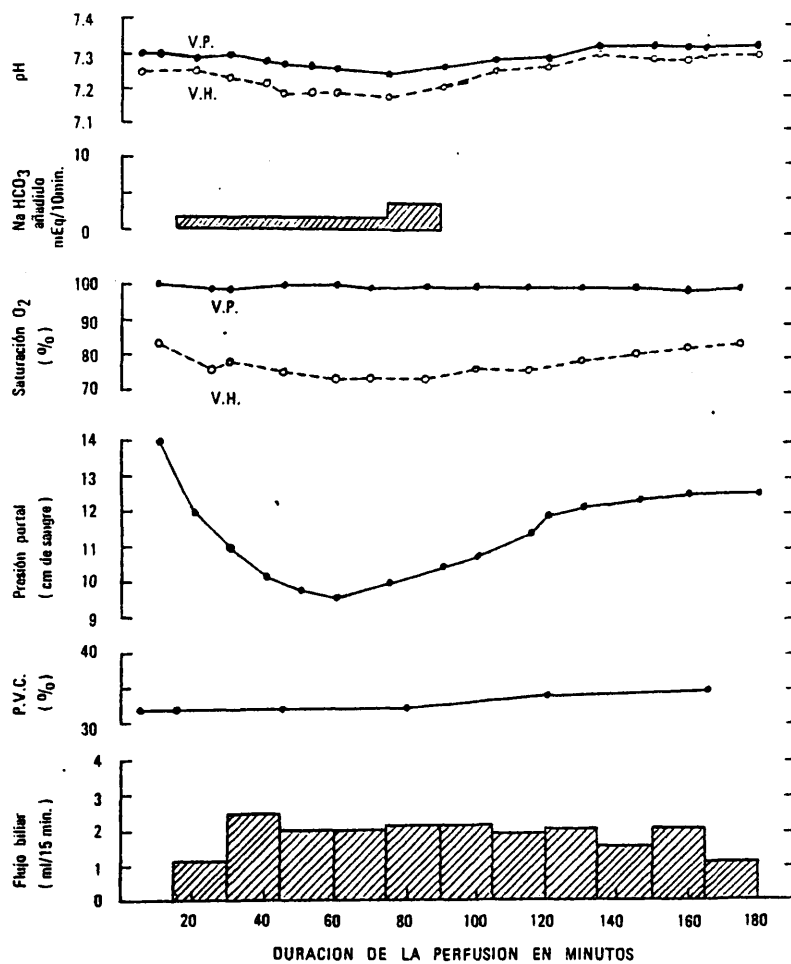
Fig. 52 Incorporación de ácido ( $H^3$ ) palmítico, en las diferentes clases de fosfolípidos en el parénquima pulmonar. PS: fosfatidilserina; PC: fosfatidilcolina; PE: fosfatidiletanolamina; - LPC: liso-fosfatidilcolina; SP: esfingomielina.

fosfolípidos pulmonares, destacando el comportamiento de los fosfolípidos esenciales en la constitución del surfactante; fosfatidil-serina, fosfatidil-etanol-amina y fosfatidil-colina. El aspecto en "sierra" de las secuencias biosintéticas, sugiere la hipótesis de una cierta periodicidad en dicha biosíntesis, acontecimiento que se refuerza ante el hecho de una secuencia morfológica similar, es decir el soporte morfológico del material surfactante (los cuerpos lamelares o de depósito de dicho material en los neumocitos tipo II), presenta una secuencia a microscopía electrónica de "llenado" - "vacío" que apoya plenamente la sugerencia indicada (Figs. 52 y 46).

Podemos concluir en resumen diciendo, que desde el punto de vista tanto estructural (microscopía óptica y microscopía electrónica), como funcional ( $pO_2$  y  $PCO_2$ ) y metabólico (biosíntesis de surfactante), la preparación cardiopulmonar autoperfundida aparece como un modelo idóneo, tanto con respecto al mantenimiento de su viabilidad orgánica, como a ofrecer un modelo experimental viable para estudios bioquímicos básicos,

#### PREPARACION HEPATICA

El valor biológico de la preparación hepática ha sido establecido a través de una serie de constantes: Producción de bilis, excreción de bromo-sulfoftaleína, capacidad de formación de urea y utilización de glucosa y lactato, a la vez que el mantenimiento de los distintos parámetros hemodinámicos (presión portal - presión de la arteria hepática). De todos modos una preservación adecuada de este órgano con la suficiente viabilidad para mantener la



Monitorización de la preparación

Fig. 53

Preparación hepática autoperfundida.

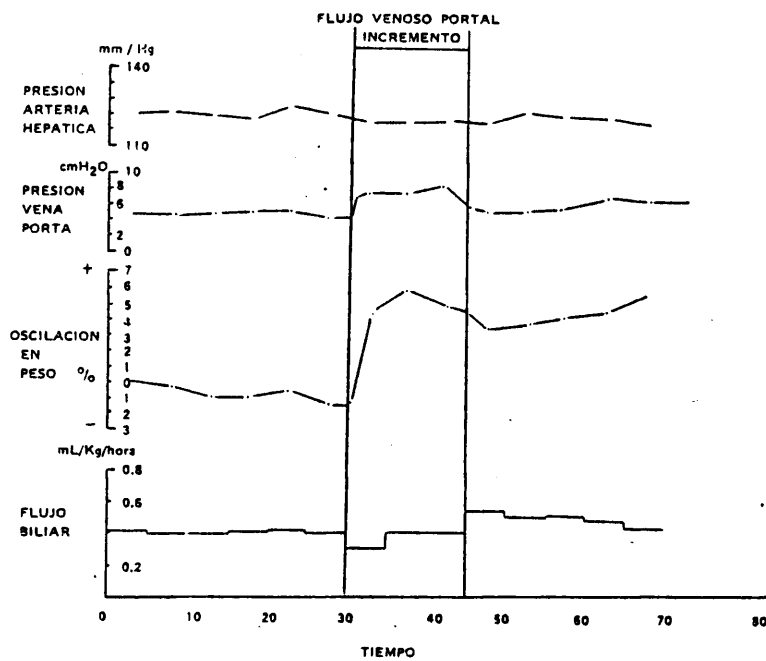


Fig. 54 Preparación hepática aislada. Perfusión mecánica a través de la v. porta, toma de presión en la arteria hepática y drenaje venoso por la v. cava inferior vía de las suprahepáticas.

Entre los 30 y 45 min. se incrementó el flujo de perfusión, pasando de 300 ml/min. a 600 ml/min.

Expresión gráfica de dicho incremento sobre la presión de la arteria hepática, vena porta, peso y flujo biliar. Controles de la monitorización hepática.

vida en un posible receptor hepatectomizado, es uno de los problemas de más difícil solución en el ya complejo campo de los trasplantes. La principal razón para el fracaso funcional de este órgano es su gran vulnerabilidad a la isquemia. Por otro lado, su propio tamaño, la complejidad de sus funciones, la gran tasa metabólicas de los hepatocitos, así como la sensibilidad del endotelio sinusoidal hacia la hipotermia, junto incluso a la misma técnica de perfusión, son las causas inmediatas del fracaso en el mantenimiento óptimo de dicho órgano.

En nuestras manos, la máxima supervivencia alcanzada, dentro de una normal funcionalidad ha sido de 240 minutos, con unos tiempos medios de 90 minutos. Frente a mayores tiempos de supervivencia alcanzados (Abouna 1974), debemos señalar que nuestras perfusiones siempre fueron realizadas en condiciones de normotermia. En este tiempo los patrones morfológicos por comprobación a microscopía óptica (Fig.55) o a microscopía electrónica (Figs. 56 y 57), aparecen dentro del campo de la normalidad, al igual que ocurre con los parámetros hemodinámicos, incluidos en límites fisiológicos, aunque el hecho señalado en la gráfica de un incremento en el peso del órgano (Fig.54), a pesar de la normalidad en las presiones tanto de la arteria hepática como de la vena porta, que aparecen en tiempos de perfusión más elevados, es consecuencia de un edema tanto intersticial (más acusado a nivel de los espacios porta) como intracelular. (El mismo problema aparece en las perfusiones con vías de retorno suprahepática y aporte combinado venoso y arterial, como en las preparaciones de perfusión hepática con retorno portal).

El grave problema señalado con respecto a la lesión anóxica del parénquima, podemos decir que no se pre -



Tabla VIII

TIEMPO DE DURACION EN MINUTOS DE LAS PREPARACIONES HEPATICAS

<u>Tiempo (min.)</u>	<u>Nº de preparaciones</u>	<u>Tipo de preparación</u>
0 .....	1 .....	Hepática autoperfundida "in situ"
20 .....	1 .....	"
44 .....	4 .....	"
50 .....	1 .....	"
75 .....	1 .....	"
90 .....	1 .....	"
120 .....	2 .....	"
180 .....	2 .....	"
240 .....	3 .....	"
15 .....	1 .....	Hepática autoperfundida "aislada"
120 .....	1 .....	Hepática mecánica "asistida"
TOTAL .....	18	

Tabla IX

CONTROL DE LAS ALTERACIONES ESTRUCTURALES  
HEPATICAS

Microscópia óptica H.E. x 200

90 minutos ( correspondiente al valor medio considerado )

Aspecto de preservación estructural en la imagen según figura, aparece una vena centrolobulillar hacia la que confluyen laminillas de hepatocitos bien ordenados, sin depósito de ninguna substancia anómala, ni lesiones de isquemia.

La desestructuración morfológica, corresponde a un artefacto de fijación.

Tabla X

CONTROL DE LAS ALTERACIONES ULTRA-ESTRUCTURALES

HEPATICAS

Microscopia electrónica

H.E. x 39.000

90 minutos ( correspondiente al valor medio considerado )

La imagen corresponde a parénquima hepático,  
comprobándose el aspecto normal del núcleo del  
hepatocito.

H.E. x 65.000

90 minutos

En la que aparece el citoplasma del hepatocito  
mostrando un componente mitocondrial normal.

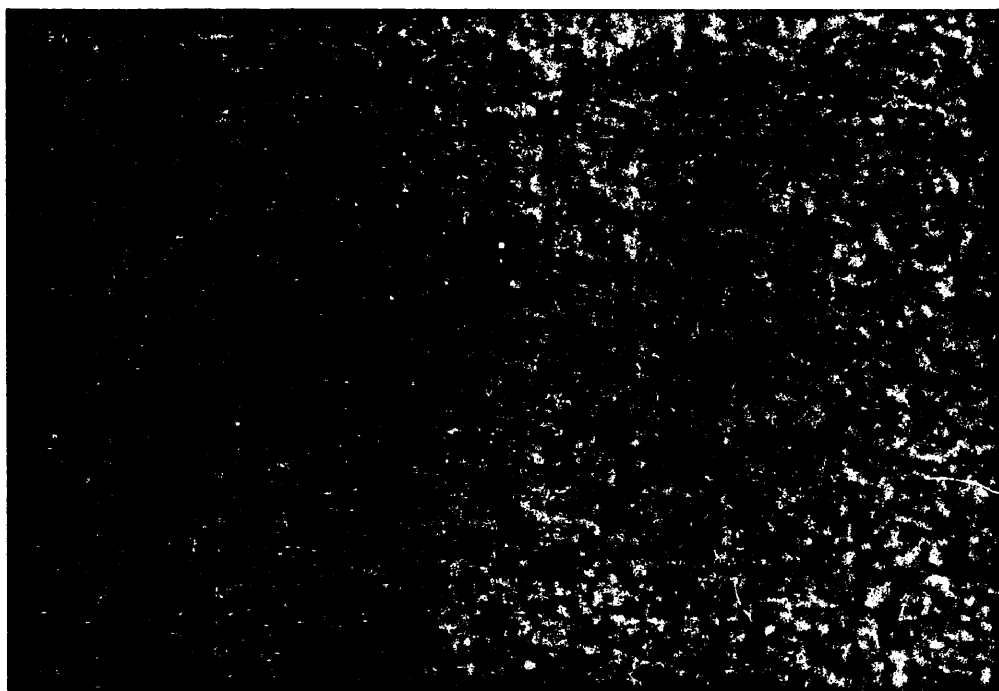


Fig. 55 Aspecto a mediano aumento del hígado (90 min.).  
Se aprecia una vena centrolobulillar hacia la  
que confluyen laminillas de hepatocitos bien  
ordenados, sin depósito de ningún tipo y con  
una cierta desfiguración en su morfología como  
artefacto de fijación (H.E. x 200).

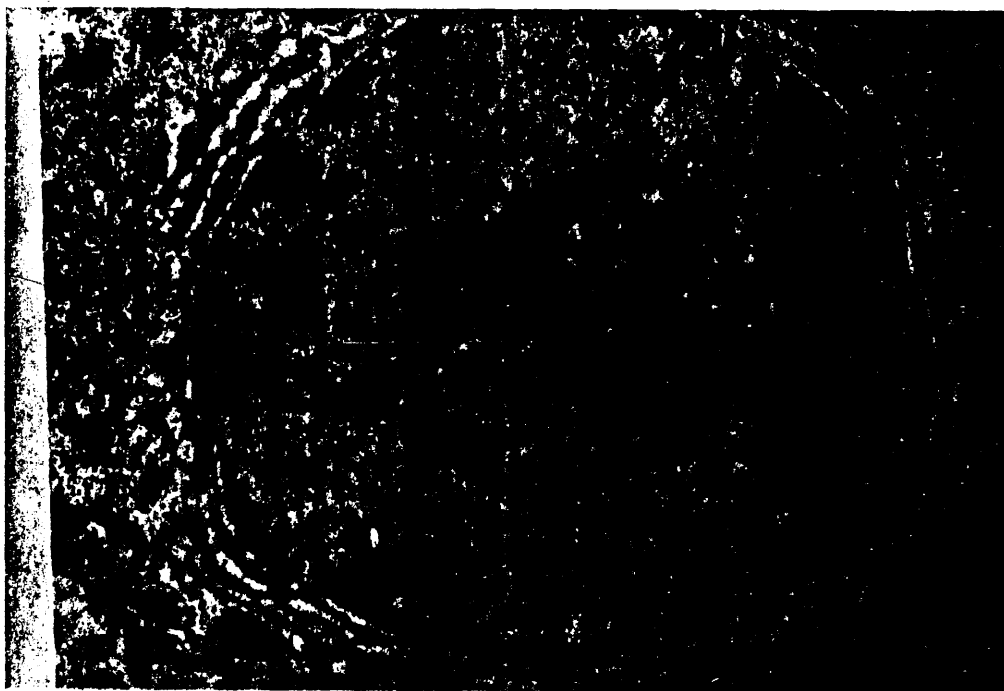


Fig. 56 Parénquima hepático (90 min.). Microscopía electrónica. Nucleo de un hepatocito. Morfología normal (x 65.000).



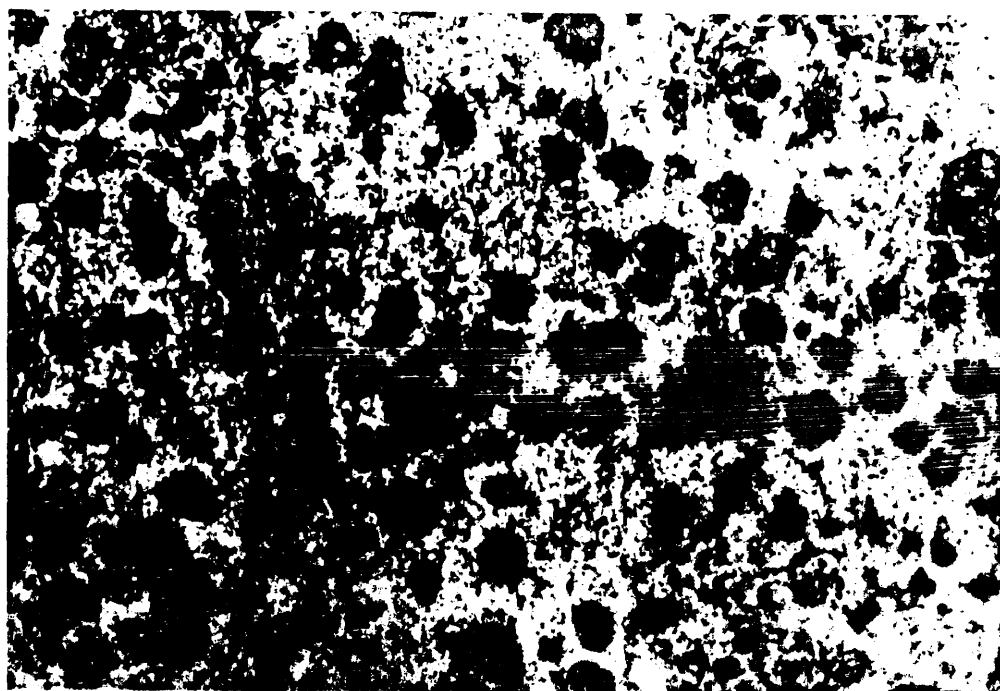


Fig. 57 Parénquima hepático (90 min.). Microscopía electrónica. Citoplasma del hepatocito mostrando un componente mitocondrial normal (x 65.000).

sentó en nuestra serie, por lo menos en los tiempos medios consideramos, puesto que tal y como se observa en la Fig.57 el componente mitocondrial del hepatocito aparece totalmente conservado.

Otro hecho a destacar es una marcada tendencia hacia la acidosis, a pesar de la normalidad de los parámetros reseñados, lo que obliga a un continuo aporte de  $\text{NaHCO}_3$  (Fig. 53) de todas formas y tal como se aprecia en dicha figura la producción de bilis (función primaria hepática) de características normales ha sido lo habitual.

En la Tabla adjunta aparecen recogidas el número de preparaciones tanto hepáticas como hepato-renales, con especificación del tipo de preparación de cada una de ellas, igualmente que en las preparaciones cardio-pulmonares, recogemos el tiempo de supervivencia expresado en minutos. De un total de 18 preparaciones hepáticas hemos obtenido en las hepáticas autoperfundidas "in situ" tiempos que oscilan entre los 20 y 240 minutos, sin las alteraciones estructurales recogidas en las Tablas IX y X, elaboradas a los 90 minutos que corresponden al valor medio considerado con imágenes de microscopía óptica y electrónica (hematoxilina-eosina a 200 aumentos a 39.000 y a 65.000 respectivamente). (Tablas VIII y XI).

Es un hecho que la preservación hepática por perfusión es una técnica extremadamente difícil, que incluso, en los grupos más experimentados (Belzer y cols. (14-15-16 y 17) 1970) no consiguieron tiempo de supervivencia superior a las 20 horas. No cabe duda de que estas dificultades

tades derivan de la complejidad biológica del hígado, así como de la complejidad en la elaboración de dichas preparaciones. En nuestro caso ha resultado fundamental que una vez lograda la total movilización de la víscera se mantenga ésta en posición durante 15 ó 20 minutos antes de su extracción definitiva, con el fin de lograr una inmediata perfusión ectópica capaz de asegurar la recupe-ración de la función celular.

Destacamos igualmente la viabilidad en la perfusión a través de la arteria hepática, con camplaje de las suprahepáticas y retorno portal, técnica que se nos ha mostrado no solo con mayor facilidad técnica para su elaboración, sino que a su vez hace más simple la monito-rización.

. Turner y Alican en 1970, han señalado por ejemplo, que la adición de succinato sódico prolonga el tiempo de preservación en unas 20 horas. Parece ser que igual beneficio se obtiene con la adición de ATP. Sin embargo, ante la última referencia, y frente al hecho de que el ATP no atraviesa las membranas celulares y que además el incremento en la concentración del mismo extracelular es tóxico para la célula, creemos que en esta línea se conseguirían mejores resultados con la adición de ácidos grasos esenciales. Igual importancia entendemos que pudiera tener la supresión en el circuito de sustancia tóxicas elaboradas por el propio hígado, aunque comparativamente y según aparece recogido en la Tabla la supervivencia en las preparaciones hepato-renales, no han diferido sustancialmente de las preparaciones hepáticas puras.

Tabla XI

TIEMPO DE DURACION EN MINUTOS DE LAS PREPARACIONES HEPATO-RENALES

<u>Tiempo (min.)</u>	<u>Nº de preparaciones</u>	<u>Tipo de preparación</u>
60 .....	1 .....	Hepato-renal autoperfundida
120 .....	2 .....	"
180 .....	2 .....	"
TOTAL .....	5	

TIEMPO DE DURACION EN MINUTOS DE LAS PREPARACIONES RENALES

<u>Tiempo (min.)</u>	<u>Nº de preparaciones</u>	<u>Tipo de preparación</u>
40 .....	1 .....	renal autoperfundida
120 .....	2 .....	"
180 .....	3 .....	"
240 .....	3 .....	"
120 .....	1 .....	renal mecánica asistida
TOTAL .....	10	

#### PREPARACION RENAL

Loebell, en 1849, realiza el primer modelo de perfusión renal con sangre disfibrinada, siendo Jacobi en 1890, el que diseñará un complejo aparato con la misma finalidad, intentando oxigenar la sangre mediante el paso de una corriente de aire a través de un primer reservorio y la retirada de las burbujas producidas por gravedad antes de verificar la perfusión renal. Usando una preparación corazón-pulmón, según el modelo descrito por Knowlton y Starling, Evans y cols. (70) intercalaron un riñón en la preparación, consiguiendo controlar durante unos cuantos minutos la presión sanguínea, el flujo y la temperatura y comprobando la producción de orina por el órgano.

El problema de la perfusión quedó resuelto con las incorporaciones técnicas de los circuitos de circulación extracorpórea con bajos volúmenes de perfusión, conseguidos por Dewall (41) en 1961. Los principales inconvenientes que surgen con la incorporación de la circulación extracorpórea, son las alteraciones provocadas en el riñón, a la vez que las inducidas en la sangre por la propia agresión mecánica; sin embargo ambos inconvenientes en la actualidad pueden considerarse que están prácticamente superados con las actuales máquinas de bajos flujos de perfusión. En nuestros casos, el problema principal, a pesar de conseguir una producción de orina de características normales durante 3-4 horas, deriva de las condiciones intrínsecas de la perfusión en sí, esto es, dependiendo de si se trata de una perfusión de tipo pulsátil o no, pues parece ser que esta condición de pulsatilidad se acepta como fundamental en los complejos mecanismos de autorregulación del propio flujo renal. Puede conseguirse una normal conservación renal, tanto morfológica (Fig.58)



como funcional, durante 4 ó 6 horas, perfundiendo a alto flujo con soluciones cristaloides. Igualmente se ha señalado, aunque no es el caso de nuestras experiencias, el mantenimiento de la normofuncionalidad durante más de 36 horas, empleando hemodiluciones extremas.

Podemos concluir, que a pesar de que la óptima conservación del órgano se logra mediante técnicas pulsátiles, con hemodiluciones medias e hipotermia moderada, con flujos de alrededor de 50 á 55 ml. /minuto, y con una presión media de 100 mm.Hg., el riñón es un órgano con pocas exigencias para su conservación, como prueba el hecho de haberse conseguido homoinjertos renales funcionantes, después de 14 horas "post-mortem", mediante técnicas de perfusión extracorpórea en cadáveres de perros, aunque según todos los autores parece ser que los tiempos óptimos de perfusión para homoinjertos renales no deben de exceder de las 6 horas. En la Tabla XI que presentamos recogiendo la duración en minutos de preparaciones renales así como el tipo de cada una de ellas puede comprobarse lo anteriormente apuntado, con tiempos que oscilan entre los 40 y los 240 minutos, mientras que el caso control de perfusión renal mecánica se mantuvo durante 120 minutos sin objetivarse ningún tipo de alteraciones.

Los principales problemas aún no resueltos en el conjunto de la problemática de la perfusión renal, derivan de los mecanismos mencionados de autorregulación y de los fenómenos de coagulación glomerular que se producen. De cualquier manera, si se mantiene una correcta presión de perfusión, pueden evitarse los fenómenos de vasoconstricción renal y las alteraciones glomerulo-tubulares.

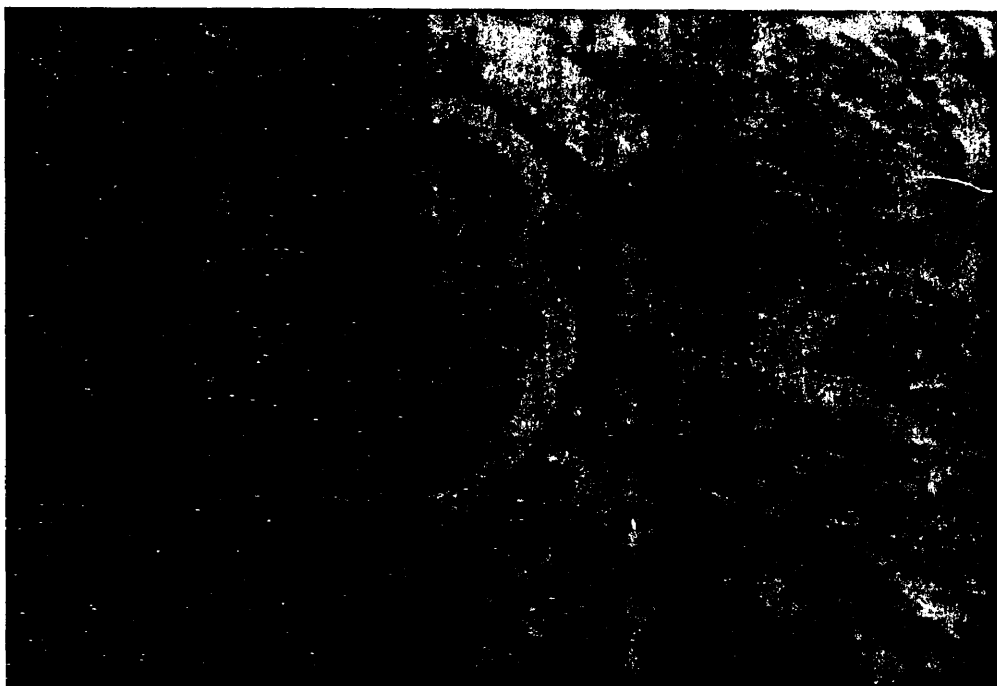


Fig. 58 Riñón. Normalidad en la morfología glomerular y tubular, a las 3 horas de perfusión del órgano aislado (H.E. x 200).

Desde un punto de vista metabólico general, aparecen otros dos hechos sin resolver. El primero, con respecto a una autosuficiencia del riñón en circuito cerrado, no estando muy claro si la víscera es autosuficiente para depurar por completo el sistema. El segundo punto deriva de las necesidades mínimas de oxigenación. A este respecto ya indicamos los pocos requerimientos de oxígeno en una preparación por perfusión con hemodilución e hipotermia, pero surge la posibilidad de un incremento en los tiempos de supervivencia aumentando las presiones de oxígeno ambientales, aunque se ha señalado, del mismo modo que en el pulmón, que unas presiones elevadas de oxígeno pueden ser realmente tóxicas para el órgano.

#### CONSIDERACIONES FINALES

Por último hemos recogido en un cuadro final las causas más frecuentes que mantienen el fracaso de las preparaciones mecánicas "asistidas", causas que obviamente no pueden aparecer en los sistemas autoperfundidos. Por el contrario las dos grandes causas de fracaso en este tipo de preparaciones vienen constituidas por la insuficiencia cardíaca progresiva y por la insuficiencia pulmonar

#### FACTORES DE FRACASO EN LOS SISTEMAS DE PERFUSION

##### I.- Perfusión mecánica

###### a.- Técnicos:

- Diseño incorrecto del circuito
- Mala oxigenación
- Inadecuada presión de perfusión
- Fallo en bombas, oxigenadores o líneas de conducción
- Desestabilización del líquido de perfusión
- Temperatura incorrecta

b.- Biológicos:

- Características inadecuadas del líquido de perfusión
- Edema tisular
- Incremento en las resistencias vasculares
- Aporte incorrecto de sustancias esenciales
- Acúmulo de metabolitos tóxicos
- Alteración del endotelio vascular con bloqueo de la microcirculación
- Liberación de enzimas lisosómicas
- Pérdida de constituyentes intracelulares fundamentales.

II.- Autoperfusión:

Eliminadas las causas de fracaso que concurren en la perfusión mecánica (diseño, oxigenación, presión, traumatismos sobre la corriente sanguínea, empleo de materiales artificiales, etc.), las causas de fracaso quedan reducidas

a:

- Insuficiencia cardíaca progresiva
- Insuficiencia pulmonar

/12 m)

#### DISCUSSION



La consecución de sistemas de perfusión en órganos aislados es ante todo un logro de la tecnología médica más ambiciosa, apoyada en el conocimiento de las ciencias médicas básicas. En la actualidad se ha logrado en el campo meramente clínico, el desarrollo de técnicas aceptables para la preservación (incluso durante años) de órganos viables, tales como la sangre o la córnea. También desde el punto de vista de la aportación clínica, el intento de conservación de otros órganos, especialmente de riñones con la finalidad posterior de su aplicación en trasplantes, es una técnica que dista mucho de poder ser considerada como rutinaria y con la que hasta la fecha se logran tiempos de conservación muy limitados. La labor de investigación programada, ofrece la esperanza de obtener y a su vez brindar los beneficios de una conservación de órganos durante un tiempo lo suficientemente largo como para permitir a su vez una aplicación clínica concreta. Por supuesto, que la consecución de este objetivo lleva implícita una tecnología a veces demasiado compleja, un conocimiento preciso tanto de la estructura como de la función hasta sus últimas consecuencias del órgano en cuestión y la perfecta compenetración de un grupo interdisciplinario de trabajo.

El objetivo de la conservación de órganos puede aceptarse orientado hacia dos grandes campos de la fisiopatología. Por un lado la finalidad ya comentada de proporcionar órganos eficaces ante distintas situaciones clínicas, lo que incluye especialmente los homotrasplantes o incluso la posibilidad de mantener aunque sea en teoría un órgano tal como el hígado y en "reposo" para su posterior reimplantación. El segundo gran objetivo tema fundamental de ésta tesis doctoral, es el estudio de los diferentes sistemas de perfusión

y la consecución de un modelo óptimo para órganos aislados.

En teoría todos los órganos pueden conservarse en "estado vivo" empleando métodos basados en los principios biológicos fundamentales. Su consecución implica des de técnicas que presuponen una inhibición de la actividad celular, hasta aquellas otras que intentan mantener un normal ambiente fisiológico. Las técnicas indicadas en primer lugar, busca la inhibición celular basándose en la reducción de la temperatura, suplementada a veces con técnicas hiperbáricas o con métodos bioquímicos y farmacológicos que del mismo modo supriman dicha función celular sin provocar lesiones en la propia célula.

Con respecto al intento de mantener un ambiente fisiológico, se vió ya desde los trabajos pioneros de Carrel y Lindbergh (30-31) en 1935, que la perfusión de un órgano aislado constituye un complejo biológico y técnico, en el que científicos de las más variadas disciplinas (fisiólogos, biólogos, bioquímicos, ingenieros y cirujanos) debían de cooperar en un propósito común: "La correcta preservación de un órgano fuera de su ambiente fisiológico normal". El estudio de la conservación de órganos en el momento actual parece haber entrado en un punto muerto, en espera de la introducción de nuevas ideas y nuevos conceptos que permitan estudios fundamentales en la biología de la conservación a nivel subcelular.

Biológica y técnicamente, la conservación de un órgano comienza en el momento en que dicho órgano es movi-  
lizado y desconectado completamente de su asiento natural.

Durante un corto espacio de tiempo dicho órgano está sujeto invariablemente a una agresión, tanto mecánica como isquémica, agresión que puede tener serias consecuencias durante la subsiguiente perfusión. Tres pasos tienen importancia capital en este período:

Rapidez y uniformidad de la pre-perfusión del órgano.

El mantenimiento de su microcirculación.

La prevención de posibles alteraciones iónicas y metabólicas a nivel de la membrana celular.

Se ha descrito que mediante el enfriamiento rápido y la infusión precoz para asegurar el mantenimiento de la microcirculación, puede reducirse al mínimo los efectos deletéreos de la isquemia. Este objetivo puede alcanzarse con la perfusión del órgano mediante una solución electrolítica a baja temperatura, conteniendo heparina y procaina o papaverina, a una presión apropiada para cada caso específico, pero debemos señalar que en nuestro propósito de verificar un estudio preciso de los diferentes aspectos bioquímicos del órgano, la adición de cualquier droga, podrían enmascarar los objetivos propuestos, y que del mismo modo, una marcada hipotermia tendría efectos similares. Por eso, de hecho, en nuestro trabajo la pre-perfusión, se limita a un lavado con solución salina heparinizada, en los casos que empleamos perfusiones de tipo mecánico, puesto que es evidente que en los casos de autoperfusión, estos problemas no se plantean.

Con el fin de evitar alteraciones del medio intracelular, cuando se verifica una pre-perfusión, la solución empleada debe de corresponder en su composición al medio intra-celular, con el fin de prevenir a su vez la pérdida intra-celular de iones, así como los efectos del edema celular que suceden a la regresión de éste hecho, cuando se instaura la perfusión definitiva.

Es evidente que la perfusión de los distintos órganos bajo condiciones de normotermia, conducen a los mejores resultados, puesto que tales condiciones son las más fisiológicas y desde luego la alteración celular inducida por la baja temperatura no puede producirse. En la práctica, la perfusión normotérmica es exclusivamente viable en los casos de autoperfusión, exigiéndose en los sistemas de perfusión mecánica un cierto grado de hipotermia más o menos moderado.

Aunque la conservación de un riñón por ejemplo puede prolongarse durante 3 días y en algunos experimentos ocasionales llegar hasta siete, en la práctica muy excepcionalmente se consiguen tiempos de perfusión válidos superiores a las 24 horas, siendo las causas del fracaso las ya descritas como causantes de los mismos en nuestras experiencias, los factores técnicos o los factores biológicos son indefectiblemente la causa del fracaso en la perfusión de órganos.

En nuestra serie ya hemos dicho que todos estos problemas aparecen en los sistemas de perfusión mecánica, sin embargo los sistemas autoperfundidos eliminan muchos factores técnicos (diseño complejo de circuito, oxigenación,

presión de perfusión, empleo de materiales artificiales), pero a su vez presentan problemas peculiares derivados de la propia naturaleza de los sistemas de bombeo y oxigenación representados por el propio sistema cardiopulmonar. En estas circunstancias los problemas o son propios de la bomba cardíaca (desarrollo progresivo de una insuficiencia cardíaca) o bien puramente pulmonares o secundarios a la condición anterior, incluso derivados de un cuadro precoz similar al descrito para la enfermedad de "membrana hialina".

Con respecto a la prevención de todas las complicaciones señaladas debemos recordar en primer lugar, que en el medio ambiente fisiológico normal, un simple órgano no es más que una parte de un complejo ambiente orgánico y en el que la interrelación de otros órganos en el mantenimiento de su viabilidad, es de importancia crucial, por tanto podemos inferir que para la prevención de dichas complicaciones cabe la posibilidad de incorporar mecanismos de depuración, tal como sistema de filtros a modo de riñón artificial, o incluso la conveniencia de intercalar en el circuito de perfusión otro órgano completo de importancia metabólica general como puede ser el caso del hígado. Este propósito queda resuelto parcialmente en nuestras preparaciones autoperfundidas, en las que existen al menos dos órganos funcionando en serie (los pulmones y el corazón en la preparación cardiopulmonar autoperfundida) o en aquellos otros sistemas que hemos montado tales como el complejo corazón-pulmón-hígado-riñón.

De las distintas preparaciones estudiadas en la presente tesis, la preparación cardiopulmonar autoperfundida ocupa un lugar preferente. Esta circunstancia se basa

en el interés de obviar los numerosos problemas que acompañan a las diferentes técnicas de perfusión mecánica, mediante la eliminación de los sistemas artificiales y su sustitución por un sistema de bombeo y oxigenación fisiológicos, representados por el binomio-corazón-pulmón el propio animal en experimentación, lo que a su vez proporciona una gran economía de medios auxiliares, permitiendo el estudio sobre éstas condiciones ya descritas a grupos de trabajo que carezcan de equipos de experimentación demasiado complejo.

Históricamente los intentos de conservar un corazón aislado se remontan a 1881 año en que Ringer demostró la posibilidad de mantener con vida un corazón de rana aislado y perfundido con solución salina isotónica. En 1898 Hapovalenko, desarrolló un método para aislar y autoperfundir corazones de mamíferos. El método empleado consistía en perfundir sangre disfibrinada a presión en la vena cava superior. La sangre, tras pasar a través del corazón derecho alcanzaba las cavidades izquierdas pasando por una anastomosis entre la arteria pulmonar y una de las venas pulmonares. El resto de los vasos a excepción de la arteria carótida eran ligados, con lo cual en cada contracción la sangre perfundía las arterias coronarias siendo expelida a través de la arteria carótida permeable.

Con estos antecedentes y tras la aceptación en los laboratorios de fisiología, de la clásica preparación de Starling, se despertó un marcado interés frente a la posibilidad de conservar la víscera cardíaca. El principal problema consistía en las alteraciones precoces desarrolladas y que no eran más que la expresión del fracaso de la



preparación. Por este motivo Daly y cols. (39) 1933, intentaron conservar el corazón aislado perfundiéndole mecánicamente. De todos modos y a pesar del interés demostrado los intentos no se vieron coronados por el éxito. En 1951 Baker (6-7-8), diseñó un sistema para la perfusión de corazones aislados con el fin de evitar los principales puntos de fracaso, en este sistema se aportan ya una serie de medidas de vigencia actual:

- Mantenimiento de una temperatura constante
- Eliminación de las burbujas producidas
- Prevención de la desecación de la superficie del órgano
- Mantenimiento de unas condiciones fisiológicas en la circulación coronaria.

Desde entonces todos los intentos se dirigieron fundamentalmente a conseguir la preservación del corazón aislado, lo que obligó a solucionar el difícil problema de aportar la suficiente cantidad de oxígeno a un órgano que lo demanda en exceso.

Con los antecedentes de los trabajos de Robicsek en 1975, que intentó rescatar la preparación de Starling como sistema de conservación de corazones y con fines dirigidos a la realización de trasplantes, nos planteamos la consecución de un modelo óptimo para la perfusión y conservación de órganos aislados y que cumplieran los requisitos exigidos en nuestra hipótesis de trabajo:

1º- Evitar al máximo la utilización de materiales artificiales en contacto con el medio de perfusión.

2º- Evitar los complejos sistemas de bombeo y oxigenación mecánicos.

3º- Posibilidad de utilizar la propia sangre del animal como medio ideal de perfusión.

4º- Obtener un modelo comparativamente tan apropiado o más que los clásicamente descritos de perfusión mecánica pura.

El mantenimiento de una estructura normal, con una función y una actividad metabólica normales de los órganos en experimentación, durante espacios de tiempo suficientemente amplios, no cabe duda que representan la demostración más evidente de que dichos sistemas de perfusión son de utilidad plena. En nuestro trabajo los requisitos hemodinámicos se cumplen en todos los puntos a lo largo de la experiencia. Logramos de igual forma, tal como ha quedado recogido en la metodología y resultados de ésta tesis, mantener unos parámetros rigurosamente normales referentes al medio de perfusión, que en la totalidad de los casos estaba constituido por la sangre del propio animal y que ha proporcionado un rendimiento muy superior al logrado por los diversos líquidos descritos por otros autores.

La viabilidad de los pulmones representa sin duda la máxima dificultad en la mayoría de las series, siendo el edema, las atelectasias y las hemorragias, las causas principales de fracaso descritas en su experiencia por Barner (10-11) 1968, Daly (39) 1933, Donald (42) 1959, etc. que intentaron mantener pulmones aislados mediante perfusión mecánica.

El protagonismo pulmonar en diferentes entidades fisiopatológicas que no presuponen su participación directa, así como todas las técnicas de perfusión, tanto en clínica como en experimentación, junto a las peculiaridades de su metabolismo, le convierten en un órgano particularmente interesante desde el punto de vista bioquímico. La aplicación de técnicas de estudio complejas, tales como la determinación de vías metabólicas específicas en este órgano, permiten una comprobación muy precisa de la viabilidad del mismo. En este sentido la producción de material surfactante, es la expresión más clara de un funcionalismo correcto en el metabolismo pulmonar.

Como ha quedado recogido ya en los resultados, hemos obtenido una normalidad estructural completa tanto del miocardio como del pulmón, solamente en los controles a largo plazo se apreciaron fenómenos de exudación y hemorragia alveolares difusos que señalan la fiabilidad de nuestra técnica frente a otros intentos de perfusión mecánica y en los que señalamos la aparición precoz de dichos exudados intraalveolares.

El empleo igualmente de precursores metabólicos marcados isotópicamente, apoya del mismo modo la superioridad de la técnica propuesta en nuestra hipótesis. No solamente hemos podido comprobar una síntesis normal de fosfatidil-colina (el fosfolípido fundamental en la composición del surfactante) através de sus dos vías principales de biosíntesis (síntesis de "novo" y síntesis por mecanismos de "trans-acilación"), sino que hemos recogido un dato totalmente original en la literatura como es la producción cíclica del surfactante por los neumocitos tipo II

y la cesión igualmente periódica de dicho material surfactante desde éstas células a la luz alveolar.

Podemos concluir con respecto a la preparación cardiopulmonar autoperfundida diciendo que:

1º- La utilización del propio corazón del animal como bomba, evita la totalidad de las alteraciones de la sangre y que a su vez es utilizada como medio de perfusión ideal.

2º- La utilización de los propios pulmones del animal como sistema de oxigenación de la preparación, evita todos los problemas que puedan derivarse de el empleo de oxigenadores artificiales y en especial los fenómenos de interfase.

3º- La preparación cardiopulmonar autoperfundida en conjunto ofrece las condiciones óptimas para la conservación durante tiempos moderadamente prolongados de su propio sistema cardiorrespiratorio.

4º- Los modelos de preparación cardiopulmonar previamente homologados a lo largo de todo este trabajo y autoperfundidos, se nos presentan como el método óptimo para la realización de técnicas de investigación bioquímica de alta precisión y complejidad.

La técnica de perfusión hepática aislada ha cumplido casi un siglo, sin embargo a pesar de tan prolongada experiencia, la consecución de una perfusión discretamente prolongada, con unos estrictos criterios de viabilidad si-

Con mucho, es el riñón por su facilidad de manejo el órgano que ha recibido la máxima atención en la temática que nos ocupa. Loebel en 1849 parece haber sido el pionero en los sistemas de perfusión renal, desde entonces los intentos se han multiplicado para alcanzar un crecimiento exponencial debido a la standarización en el empleo de los trasplantes renales. Debe señalarse que los intentos de perfusión han sido destinados prácticamente en su totalidad a la conservación más completa posible encaminada a la utilización de dicha víscera en trasplantes, basándose dichas técnicas de perfusión en el empleo hipotermia, o de soluciones electrolíticas y dándose al contrario que en otros órganos una importancia capital al carácter pulsátil de la perfusión.

En nuestra serie experimental el riñón ha servido exclusivamente para dos fines:

1º.- Servir como entrenamiento dadas sus características anatómicas para perfeccionar la técnica general de perfusiones de órganos aislados.

2º.- Intercalarlo en diferentes circuitos de perfusión de órganos, utilizándolo como filtro o depurador de dicho sistema sobre todo en perfusiones hepáticas. En este caso el papel de órgano depurador se ha puesto de manifiesto por la capacidad de formación y excreción de una orina de caracteres fisiológicos, a la vez que por mantener unos niveles aceptables de sustancias de desecho tales como la urea.

En todos los casos junto al cumplimiento de su labor fisiológica y al igual que ocurre con otros órganos en las distintas preparaciones, su morfología mostró unos patrones de completa normalidad.

que constituyendo en la actualidad un problema muy complejo de difícil solución. Las razones de éstos fracasos, aún siendo múltiples, se basan fundamentalmente en la gran vulnerabilidad del órgano a la isquemia, solo sobrepasado en este sentido por el cerebro. Son numerosas las series en caminadas a solucionar estos problemas debiendo destacarse la presentada por Abouna (1) 1968. Nuestro propósito, siguiendo la hipótesis señalada para nuestro trabajo, se completa con la utilización cardiopulmonar como sistema de perfusión del hígado aislado. Debemos señalar que las difi cultades técnicas son extremas, pero que cuando se resuelven favorablemente, no cabe duda de que solucionan con creces los problemas planteados. Esta solución se debe evidentemen temente a que en ningún momento hay interrupción en la per fusión del órgano, pues en las preparaciones cardiopulmonares hepáticas autoperfundidas "in situ", se mantiene intacto el aporte de sangre vía troncocelíaco-arteria hepática.

Las comprobaciones ultraestructurales, ofrecen una morfología hepática conservada, siendo destacable la absoluta normalidad del componente nuclear, mitocondrial y retículoendoplasmático. Lo idóneo de la perfusión ha sido igualmente re cogido en los resultados, como expresión de un normal meta - bolismo en base a la producción de bilis, excrección de bromo-sulfoftaleína, capacidad de formación de urea y utilización de glucosa y lactato.

A pesar de lo ideal que a nuestro juicio resulta la autoperfusión autóloga y considerando las dificultades téc - nicas expuestas, no cabe duda de que la perfusión mecánica del hígado en ciertos casos mantiene su vigencia a pesar de las desventajas que se derivan de este tipo de perfusión.



Como conclusión a la presente discusión, haremos especial referencia a una serie de hechos que consideramos especialmente importantes en nuestra tesis. En primer lugar recalcamos la importante diferencia existente entre estudios de perfusiones verificadas en condiciones de normotermia (temperatura peculiar de la especie en estudio) y aquellos otros llevados a cabo bajo condiciones de hipotermia. La totalidad de nuestra serie se llevó a cabo en condiciones de normotermia, es decir que reflejan una condición totalmente fisiológica. La mayoría de las experiencias recogidas en la literatura no se realizaron bajo éstas condiciones, motivo de resultados discordantes en ocasiones a los registrados por nosotros, sobre todo en lo referente a estudios metabólicos. Con referencia a este hecho debemos igualmente señalar la falta de unidad de criterio en el campo de la perfusión de órganos, por lo que la comparación de resultados procedentes de distintos laboratorios es prácticamente imposible. Debe exigirse el estudio exhaustivo y sistematizado de los diferentes factores implicados en los estudios de perfusión de órganos, tales como el medio de perfusión, sistema de perfusión, presión de perfusión, etc., para poder establecer una mínimas condiciones de equiparidad y posterior constatación de resultados.

Entre los puntos que consideramos importante, a parte de los ya reflejados en 1931 por Henningway (59) y más recientemente por Beltzer (14-15-16-17) entre 1934 y 1938, respecto a la necesidad de intercalar diferentes filtros en el circuito, señalamos lo inadecuado de la utilización en la mayoría de las ocasiones de las más variadas formas de fluido terapia, tales como las de Ringer, Locke o Tirode, cuya utilidad se limita a perfusiones de muy corta duración. A este

respecto Belt, Smith y Whipple (13) indicaron ya en 1920, que cualquier intento de reemplazar la sangre del propio animal de experimentación por otro tipo de solución, no podría de ninguna manera, reflejar una auténtica condición fisiológica.

Otro punto de interés, es la necesidad o no de intercalar un órgano de depuración en el circuito, sobre todo en el caso de perfusiones renales. Este problema fue ya tratado por Belzer (14) en 1968 como uno de los puntos claves para el avance en el estudio de los sistemas de perfusión de órganos.

Reconsiderando la finalidad de los sistemas de perfusión, deberemos de obtener una aplicación tanto práctica como teórica. No cabe duda de que la idea de Carrel (30-31) de buscar el éxito en un sistema de perfusión, en su prolongación indefinida, por el mero hecho de lograrlo, carece de cualquier sentido. Nosotros creemos que la justificación del avance en la tecnología de los mencionados temas, debe descansar sobre la consecución de una estricta comprobación fisiológica y bioquímica.

La barrera bioquímica de los sistemas de perfusión, se encuentra limitada, según lo propuesto por Humphries (66-67) en 1966 por problemas generales asociados al sistema artificial de perfusión, estos problemas: Vasoconstricción obstrucción capilar, edema tisular, contaminación, traumatismo de la sangre por el mecanismo de bombeo e insuficiencia en el aporte de sustratos energéticos, son sobre los que dicho autor hace un especial hincapié para que se logre su correcta resolución.

Hasta la fecha dos grupos de reconocido prestigio en el tema han aportado soluciones concretas. El grupo de Coyne, Rudolff y Allport (38) en 1968, que indica como condición primordial el mantener la presión de perfusión aproximadamente y con un flujo continuo de 60 mm./Hg. y el grupo de Belzer (14-15-16-17) entre los años 1964 y 1968 que señala la adecuada filtración del medio de perfusión, como hecho fundamental en la prevención de la disminución del flujo capilar y del edema tisular.

Como comentario final podemos afirmar que mientras la perfusión de órganos aislados, ha representado un método científico para el estudio de la fisiología de los diferentes sistemas, desde los clásicos estudios de Daly (39) a principios de 1930, pocos esfuerzos se han realizado hasta la actualidad para aplicar tales técnicas a la investigación de problemas básicos relacionados con la patología clínica, aunque últimamente los estudios de perfusión sobre hígado en shock por Hardcastle y Ritchie, el efecto de diferentes agentes anestésicos sobre el mismo órgano estudiado por Strunin, o el efecto de la endotoxina sobre el pulmón, pueden testimoniar la dirección actual en que discurre el estudio de estos problemas.

La presente tesis aporta sin duda un elemento que prácticamente evita la totalidad de las alteraciones señaladas como limitantes en los sistemas de perfusión:

"LA AUTOPERFUSION OFRECE LAS MAXIMAS POSIBILIDADES EN EL DESARROLLO Y EN LA REALIZACION DE LOS SISTEMAS DE PERFUSION EN ORGANOS AISLADOS".

CONCLUSIONES

### CONCLUSIONES

- 1.- *Los sistemas de autoperfusión en órganos aislados, ofrecen las ventajas de los modelos experimentales obtenidos tanto "in vitro" como "in vivo", debiéndose a que el órgano se contempla como una entidad totalmente desconectada del resto de la fisiología ( hormonal y neurológica ), a la vez que se conserva su integridad morfofuncional.*
- 2.- *En nuestro caso, la validez del modelo anatómico se ha basado en la estricta conservación estructural del órgano en estudio, comprobada mediante microscopía óptica y electrónica.*
- 3.- *La correcta función fisiológica de los distintos órganos de perfusión se ha basado además en la comprobación de sus funciones específicas ( intercambio gaseoso para el pulmón, formación de bilis para el hígado, formación de orina para el riñón y suficiencia en la perfusión por parte del corazón ), así como en el estudio de las vías metabólicas esenciales ( biosíntesis de fosfolípidos en pulmón ).*
- 4.- *La más completa normalidad en el funcionamiento del sistema ( órgano perfundido y líquido de perfusión ), se ha logrado por la combinación de cuatro hechos fundamentales:*
  - a) *La autoperfusión, es decir la utilización del complejo cardio-pulmonar del animal como sistema de perfusión.*
  - b) *La utilización de la propia sangre del animal en experimentación como líquido de perfusión.*
  - c) *Normotermia de la perfusión.*
  - d) *Carácter de pulsatibilidad del flujo.*

- 5.— *No cabe duda que en aquellas preparaciones, en las que el intento de aplicar un sistema de autoperfusión, presuponga unas dificultades técnicas extremas o cuando se instaura una insuficiencia cardio-pulmonar progresiva, la utilización de sistemas mecánicos tiene plena vigencia, siempre que sea utilizada la sangre del propio animal como medio de perfusión y que a su vez se controle estrechamente la presión de perfusión.*
- 6.— *Las características del estudio de la preparación cardio-pulmonar autoperfundida, han demostrado no solamente la viabilidad de ambos órganos durante el tiempo suficiente como para poder apuntar aplicaciones concretas, sino que se ha mostrado asimismo y con plena justificación como un modelo con las máximas posibilidades para el estudio de diferentes procesos bioquímicos básicos: en nuestro caso ha servido para demostrar el patrón cíclico en la formación de fosfatidilcolina ( fosfolípido fundamental en la composición del surfactante pulmonar ), así como su cesión rítmica al alveolo.*
- 7.— *Finalmente los sistemas de perfusión de órganos aislados, aparte de proporcionar un excelente entrenamiento básico ( preparaciones complejas, sistemas de monitorización, etc. ) son los idóneos para el estudio de las funciones viscerales, presentándose como extremadamente útiles para ser empleados en línea de investigación metabólica, incluso a nivel subcelular, al estar libres de cualquier influencia extrínseca. Consideramos que son ideales para el estudio de los efectos locales de procesos patológicos diversos o para el estudio de la agresión mecánica de diferentes técnicas quirúrgicas.*



## R E S U M E N

En nuestro estudio sobre la perfusión de órganos, hemos encontrado que dichos órganos han sido aislados y perfundidos con diferentes propósitos (conservación para posterior trasplante, con finalidades terapéuticas, como en las indicaciones de perfusión local con antimitóticos, o como soporte temporal durante el fracaso reversible del órgano tal como en los casos de hepatitis fulminante) pero fundamentalmente y en la mayoría de los casos, con la finalidad de incrementar nuestros conocimientos sobre la fisiología y fisiopatología de los diferentes sistemas. La presente tesis se ha ocupado fundamentalmente de éste último aspecto.

Desde los trabajos pioneros de Carrel y Linbergh (30-31), la perfusión de órganos aislados ha progresado hacia una compleja organización técnica y biológica, en la que están implicadas diferentes disciplinas, cooperando todas hacia un propósito común, "la normal preservación de los órganos fuera de su ambiente fisiológico".

Dos hechos merecen especial atención. En primer lugar, se requiere un alto nivel quirúrgico, a la vez que un conocimiento preciso de la fisiología del propio órgano, junto a una técnica que ha de soportar todo el peso de la preparación de los órganos aislados. En segundo lugar, el estudio de órganos perfundidos se sitúa a medio camino entre los estudios "in vivo", con el animal en su totalidad, e "in vitro", es decir con fracciones y subfracciones del órgano, en medios de cultivo o incubación. Tales preparaciones ofrecen por tanto, las ventajas de los primeros, es decir existe la posibilidad del estudio de un órgano "in toto", más las oportunidades que se deriven de una total desconexión nerviosa y humoral del sistema.

Durante el actual trabajo, hemos logrado perfundir con éxito diferentes órganos, pulmón, corazón, hígado y riñón, algunos de ellos presentan dificultades peculiares, así por ejemplo, el hígado tiende a desarrollar espasmo venosos, el riñón espasmos arteriales y los pulmones propenden hacia la formación de edema. En nuestras manos, la continuidad en la experimentación, con el consiguiente perfeccionamiento técnico y el cada vez más completo conocimiento bioquímico, tales problemas han sido progresivamente solventados, consiguiendo unas preparaciones que cumplen las exigencias requeridas según las líneas más actuales de dicha problemática.

Desde el aspecto biológico y técnico, la preservación del órgano, comienza en el momento de su movilización y desconexión vascular. Durante este breve intervalo, el órgano se encuentra sometido a una doble agresión, mecánica e isquémica, doble agresión que puede provocar consecuencias irreparables durante la siguiente fase correspondiente a la perfusión. Teóricamente, perfusión de órganos bajo condiciones de normotermia, tal como hemos trabajado, proporciona los mejores resultados, al mantener unas condiciones fisiológicas óptimas, pero de igual modo, el más mínimo fallo técnico se sigue de una lesión hipóxica irreparable. Bajo perfusión normotérmica se han conseguido tiempos de funcionamiento considerados como normales, tal como han quedado reflejados en los estudios morfológicos, ultraestructurales y bioquímicos presentados y equiparables a los de otras series.

La preparación pulmonar ha sido la más estudiada, y creemos haber logrado un estudio muy completo. El funcionamiento de las diferentes vías de biosíntesis de fosfolípidos,

por parte de los neumocitos tipo II, indica una perfecta integridad metabólica del sistema, puesta de manifiesto a través de una correcta función de intercambio de gases a lo largo de las 3 ó 4 horas de perfusión.

Para terminar podemos concluir diciendo que los estudios sobre órganos aislados perfundidos tienen mucho que ofrecer. Proporcionan un excelente entrenamiento básico en la realización de preparaciones cada vez más complejas, (bancos de órganos aislados o conectados en diferentes series). Proporcionan la posibilidad de emplear técnicas de control y seguimiento de vías metabólicas con los métodos más complejos y actuales posibles y ofrecen a la vez oportunidades ilimitadas con respecto al estudio de la función visceral. Pueden utilizarse desde el punto de vista fisiológico, en el estudio de respuestas selectivas sobre todo relacionadas con procesos metabólicos a nivel celular, libres de la influencia de estímulos nerviosos u hormonales, e incluso para el estudio de los efectos locales de diferentes estados patológicos o técnicas quirúrgicas sobre la víscera.

## BIBLIOGRAFIA

1. Abouna, G.M. Pig liver perfusion with human blood. The effect of preparing and flushing the liver with various balanced solutions on its subsequent viability and function. *Brit.J.Surg.* 55, 761-768 (1968).
2. Ackermann, J.R., and Barnard, C.N. Successful storage of kidneys. *Brit. J.Surg.* 53, 525-532 (1968).
3. Athereya, B.H., Coriell, L.L., Greene, A.E., and Lehr, H.B. Preservation of functioning rabbit hearts in vitro. Preliminary communication on a new approach. *Arch. Surg.* 97, 947-953 (1968).
4. Ausman, R.K., and Aust, J.B. Analysis of agents for use in isolated perfusion. *Surg. Forum* 12, 123-124 (1961).
5. Bainbridge, F.A., and Evans, C.L. The heart, lung, kidney preparation. *J. Physiol (London)* 48, 278-286 (1914).
6. Baker, J.B.E. An improved apparatus for mammalian heart perfusion. *J. Physiol. (London)* 115, 30P-32P (1951).
7. Baker, J.B.E. Some observations upon isolated perfused human foetal hearts. *J. Physiol. (London)* 120, 122-128 (1953).
8. Baker, R.R., Merz, T., Kim, S.T., and Tolo, V.T. Evaluation of isolated perfused segments of dog ileum as a means of growing tumors. *J. Surg. Res.* 8, 458-461 (1968).
9. Barcroft, J., and Dixon, W.E. Gaseous metabolism of mammalian heart. *Physiol (London)* 35, 182-204 (1907).
10. Barner, H.B., Jellinek, M., Willman, V.L., and Hanlon, C.R. Cardiac perfusion with dextran-dimethyl sulfoxide for cardiac preservation. *J. Surg.Res.* 8, 384-391 (1968).



11. Barnes, B.A., Streider, D.J., and Kazemi, H. The evaluation of lung preservation by functional studies in the perfused isolated dog lung. In *Organ Perfusion and Preservation* (J.C. NORMAN, ed.), pp. 609-619. Appleton, New York, 1968.
12. Belin, R.P., Gilsdorf, R.B., and Leonard, A.S. Study of bathing media on prolonged ex-vivo perfused organs. *Federation Proc.* 25, 660 (1966).
13. Belt, A.E., Smith, H.P., and Whipple, G.H. Factors concerned in the perfusion of living organisms and tissues. *Am. J. Physiol.* 52, 101-120 (1920).
14. Belzer, F.O., Park, H. Y., and Vetto, R.M. Factors influencing renal blood flow during isolated perfusion. *Surg.Forum*, 15, 222-224 (1964).
15. Belzer, F.O., Ashby, B.S., and Dunphy, J.E. 24-hour and 72-hour preservation of canine kidneys. *Lancet II*, 536-538 (1967).
16. Belzer, F.O., Ashby, B.S., Huang, J.S., and Dunphy, J.E. Etiology of rising perfusion pressure in isolated organ perfusion. *Ann. Surg.* 168, 382-391 (1968).
17. Belzer, F.O., Ashby, B.S., May, R.E., and Dunphy, J.E. Isolated perfusion of whole organs. In *Organ Perfusion and Preservation* (J.C. Norman, ed.), pp. 3-12. Appleton, New York, 1968.
18. Bickford, R.G., and Winton, F.R. The influence of temperature on the isolated kidney of the dog. *J. Physiol. (London)* 89, 198-219 (1937).
19. Bleehen, N.M., and Fisher, R.B. The action of insulin on the isolated rat heart. *J. Physiol. (London)* 123, 260-276 (1954).
20. Bloch, J. H., Manax, W.G., Eyal, Z., and Lillehei, R.C. Heart preservation in vitro with hyperbaric oxygenation and hypothermia. *J. Thoracic Cardiovascular Surg.* 48, 969-979 (1964).

21. Blumenstock, D.A., Hechtman, H.B., and Collins, J.A. Preservation of the canine lung. *J.Thoracic Cardiovascular Surg.* 44, 771-775 (1962).
22. Boxall, T.A., Hose, S., and Eiseman, B. The ex-vivo perfused spleen. *Surg. Forum* 17, 260-262 (1966).
23. Boxall, T.S., Hose, A., and Eiseman, B. Experimental evaluation of heterologous, ex-vivo spleen perfusion. *Ann.Surg.* 166, 118-128 (1967).
24. Boxall, T.A., Hose, S., and Eiseman, B. Immunological competence of the isolated perfused pig spleen. *J. Surg.Res.* 8, 172-176 (1968).
25. Brauer, R.W., Pessotti, R. L., and Pizzolato, P. Isolated rat liver preparation; bile production and other basic properties. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 78, 174-181 (1951).
26. Brettschneider, L., Daloze, P.M., Porter, K.A., Groth, C.G., Hutchinson, D.E., and Starzl, T.E. The use of combined preservation techniques for extended storage of orthotopic liver homografts. *Surg. Gynecol. Obstet.* 126, 263-274 (1968).
27. Brodie, T.G. The perfusion of surviving organs. *J.Physiol. (London)* 29, 266-275.
28. Burrows, M.T. A method of furnishing a continuous supply of new medium to a tissue culture in vitro. *Ana.Record* 6, 141-144 (1912).
29. Calne, R. Y., Pegg, D.E., Pryse-Davies, J., and Brown, F. L. Renal preservation by ice cooling. *Brit.Med. J.* 11, 651-655 (1963).
30. Carrel, A., and Lindbergh, C.A. The culture of whole organs. *Science* 81, 621-623 (1935).
31. Carrel, A., and Lindbergh, C.A. *The Culture of Organs.* Harper (Heber), New York, 1938.

32. Cassie, G.F., Couch, N.P., Dammin, G.J., and Murray, J.E. Normothermic perfusion and replantation of the excised dog kidney. *Surg. Gynecol. Obstet.* 109, 721-728 (1959).
33. Chapman, N.D., Goldsworthy, P.D., Volwiler, W., Nyhus, L.M., and Martinis, A.J. The isolated perfused bovine liver. *J. Exptl. Med.* 113, 981-996 (1961).
34. Chute, A. L., and Smyth, D. H. Metabolism of the isolated perfused cat's brain. *Quart. J. Exptl. Physiol.* 29, 379-394 (1939).
35. Clark, A.J. The effects of alterations of temperature upon the functions of the isolated hearts. *J. Physiol. (London)* 54, 275-286 (1920).
36. Cohen, S., and Gordon, A. H. Catabolism of plasma albumin by the perfused rat liver. *Biochem. J.* 70, 544-551 (1958).
37. Couch, N.P., Cassie, G.F., and Murray, J.E. Survival of the excised dog kidney perfused in a pump oxygenator system. *Surgery* 44, 666-682 (1958).
38. Coyne, J.A. Rudolf, L.E., and Allport, E. L. Perfusion pressure and its relation to vascular resistance in isolated canine kidneys. In *Organ Perfusion and Preservation* (J.C. Norman, ed.), pp. 33-34. Appleton, New York 1968.
39. Daly, I. de B., and Thorp, W.V. An isolated mammalian heart preparation capable of performing work for prolonged periods. *J. Physiol. (London)* 79, 199-217 (1933).
40. Demster, W.J., Kountz, S. L., and Janovic, M. Simple kidney-storage technique. *Brit. Med. J.* 1, 407-410 (1964).
41. DeWall, R.A. Theme and variations on blood oxygenators. *Surgery* 50, 931-940 (1961).
42. Donald, D.E.A. A method for perfusion of isolated dog lungs. *J. Appl. Physiol.* 14, 1053-1054 (1959).

43. Dritsas, K.G., and Kowalewski, K. Perfusion of the isolated canine stomach. *Brit.J. Surg.* 53, 732-735 (1966).
44. E iseman, B., Knipe, P., McCall, H.A., and Orloff, M.J. Isolated liver perfusion for reducing blood ammonia. *Arch.Surg.* 83, 356-362 (1961).
45. E iseman, B., Knipe, P., Koh, Y., Vormell, L., and Spencer, F.C. Factors affecting hepatic vascular resistance in the perfused liver. *Ann.Surg.* 157, 447-532 (1963).
46. E iseman, B., Bryant, L., and Waltuch, T. Metabolism of vasomotor agents by the isolated perfused lung. *J. Thoracic Cardiovascular Surg.* 48, 798-806 (1964).
47. E iseman, B., Liem, D.S., and Raffucci, F. Heterologous liver perfusion in treatment of hepatic failure. *Ann.Surg.* 162, 329-344 (1965).
48. Evans, C. L. The gaseous metabolism of the heart and lungs. *J. Physiol. (London)* 45, 213-234 (1912).
49. Galli-Mainini, C.A. simplified perfusion apparatus for the maintenance of living organs in vitro. *J. Exptl. Med.* 73, 745-756 (1941).
50. Gans, H., and Lowman, J. T. The uptake of fibrin and fibrin degradation products by the isolated perfused rat liver. *Blood* 29, 526-539 (1967).
51. Garcon, A.A., Kornberg, E., Pangon, J., Stuckey, J. F., and Karlson, K.E. Myocardial activity after 24 hours of hypothermic (4 C) storage. *Cryobiology* 5, 347-351 (1969).
52. Geiger, A., and Magnes, J. The isolation of the cerebral circulation and the perfusion of the brain in the living cat. *Am.J. Physiol.* 149, 517-537 (1947).
53. Geiger, A. Technic of brain perfusion in vitro. *Methodos Med. Res.* 9, 248 (1961).

54. Gesell, R.A. On the relation of pulse pressure to renal secretion. *Am.J. Physiol.* 32, 70-93 (1913).
55. Golan, F., and Clark, L.C. Organ perfusion with fluorocarbon fluid. *Physiologist* 9, 191 (1966).
56. Gordon, A. H. The use of the isolated perfused liver to detect alteration to plasma protein. *Biochem. J.* 66, 255-264 (1957).
57. Hayakawa, I. The experimental study on isolated brain perfusion. *Brain Nerve (Tokyo)* 15, 967-980 (1963).
58. Hechter, O. Lymphocyte drainage from the isolated rabbit spleen by adrenal cortical extract. *Endocrinology* 42, 285-306 (1948).
59. Hemingway, A. Some observations on the perfusion of the isolated kidney by a pump. *J. Physiol. (London)* 71, 201-213 (1931).
60. Hendry, W.F., Struthers, N.W., Duguid, W.P., and Hopkinson, WJ. Twenty-four hour storage of kidneys. *Lancet* 1, 1221-1225 (1968).
61. Hewitt, R. L., and Creech, O. History of the pump oxygenator. *Arch.Surg.* 93, 686-696 (1966).
62. Hymans, C., Bouckaert, J.J., Jourdan, F., Nowak, S.J.G., and Farber, S. Survival and revival of nerve centers following acute anemia. *A.M.A. ArchNeurol. Psychiat.* 38, 4 304 (1937).
63. Hinshaw, L.B., Ballin, F.M., Day, S.B., and Carlson, C. H. Tissue pressure and autoregulation in the dextran perfused kidney. *Am.J. Physiol.* 197, 853-859 (1959).
64. Hinshaw, L.B., Day, S.B., and Carlson, C. H. Tissue pressure as a causal factor in the autoregulation of blood flow in the isolated perfused kidney. *Am.J. Physiol.* 197, 309-312 (1959).

65. *Hboker, D.R. The perfusion of the mammalian medulla: The effect of calcium and of potassium on the respiratory and cardiac centers. Am. J.Physiol. 38, 200-208 (1915).*
66. *Humphries, A. L, Organ perfusion: A review. Transplantation 5, 1138-1153 (1967).*
67. *Humphries, A. L, Russell, R., Stoddard, L.D., and Moretz, W. H Three-day kidney preservation: Perfusion with hypothermic, diluted blood or plasma. Surgery 63, 646-652 (1968).*
68. *Karow, A.M., Webb, W.R., and Stapp, J.E. Preservation of heart by freezing. Arch. Surg. 91, 572-574 (1965).*
69. *Kiser, J.C. Telander, R. L, Peterson, T.A., Coe, J.J., and Hitchcock, C.R. Canine renal autografts. Arch. Surg. 83, 502-511 (1961).*
70. *Knowlton, F.P., and Starling, E. H The influence of variations in temperature and blood pressure on the performance of the isolated mammalian heart. J.Physiol. (London) 44, 206-219 (1912).*
71. *Kountz, W.B. Revival of human hearts. AnnInternal Med. 10, 330-336 (1936).*
72. *Kovacs, S., Persky, L, Stueber, P., and Uletsky, S. The protective value of hypothermia in renal anoxia: Evaluation by selective cooling of the kidney. Anesthesia Analgesia 48, 157-161 (1959).*
73. *Kuliabko, A.A. Experiments with resuscitation of heart. Izv. Imp. Akad. Nauk 16, 175-183 (1902).*
74. *Levy, J.F., Bernard, H.R., and Monafu, W.F. Isolation and storage of artificially oxygenated mammalian hearts. J. Am. Med. Assoc. 191, 1006-1008 (1965).*
75. *Liem, D.S., Waltuch, T. L, and E iseman, B. Function of the ex vivo pig liver perfused with human blood. Surg.Forum 15, 90-91 (1964).*



76. Lindbergh, C.A. An apparatus to circulate liquid under constant pressure in a closed system. *Science* 73, 586 (1931).
77. Lindbergh, C.A. An apparatus for the culture of whole organs. *J. Exptl. Med.* 62, 409-431 (1935).
78. Lindbergh, C.A., Perry, V.P., Malinin, T.J., and Mouer, G. H. An apparatus for the pulsating perfusion of whole organs. *Cryobiology* 3, 252-260 (1966).
79. Linn, B.S., Cannaday, W., Breton, M., and Gollan, F. Kidney preservation by perfusion with organic liquids. *Surg. Forum* 18, 278 (1967).
80. Lloyd, W.D.M. The action of calcium on the isolated human foetal heart. *J. Pharmacol.* 36, 185-193 (1929).
81. Long, J.A. A pulsating circulation apparatus for tissue cultures, embryos and small organs. *Univ. Calif.(Berkeley) Publ. Zool.* 43, 211-212 (1939).
82. Lower, R.R., Stofer, R.C., Hurley, E.J., Dong, E.D., Cohn, R.B., and Shumway, N.E. Successful homotransplantation of the canine heart after anoxic preservation for seven hours. *Am. J. Surg.* 104, 302-305 (1962).
83. Mandelbaum, I., Berry, J., Silbert, M., Burns, W. H, and Rothe, C. Regional blood flow during pulsatile and non-pulsatile perfusion. *Arch. Surg.* 91, 771-774 (1965).
84. Machioro, T. L., Huntley, R.T., Waddell, W.R., and Starzl, T.E. Extracorporeal perfusion for obtaining post mortem homografts. *Surgery* 54, 900-911 (1963).
85. Martin, N. H.A. A new method of studying the mammalian heart. *Studies Biol. Lab. Johns. Hbpkins Univ.* 11, 119 (1881).
86. Matloff, D.B., and Gowen, G.F. Hypothermic perfusion: Protection for the ischemic kidney. *ArchSurg.* 85, 999-1003 (1962).

87. Moore, A.R. et al. The ex vivo perfused spleen as a source of immune lymphocytes. *Surg. Gynecol.* 126, 1251-1256 (1968).
88. Moore, A.R., Mieny, C.J., and E iseman, B. Vascular resistance in splenic perfusion. *J.Surg. Res.* 8, 558-562 (1968).
89. Moore, A.R., Paton, B.C., and E iseman, B. Reduction of splenic vascular resistance during perfusion by pluronic F68. *J.Surg. Res.* 8, 563-566 (1968).
90. Wakagawa, T. On the coronary circulation in the heart-lung preparation. *J. Physiol. (London)* 56, 340-347 (1922).
91. Perry, V.P., Lindbergh, C.A., Malinin, T.J., and Mauer, G. H Pulsatile perfusion of whole mammalian organs. In *Organ Perfusion and Preservation* (J.C. Norman, ed.), pp. 203-216. Appleton, New York, 1968.
92. Redo, S.F., Glenn, F., and Dime, S.. An evaluation of the function of guinea pig hearts removed after death using the isolated perfusion technic. *J.Surg. Res.* 2, 300-306 (1962).
93. Redo, S.F., and Dime, S. Function of isolated, perfused guinea pig hearts stored under various conditions. *Arch. Surg.* 92, 269-272 (1966).
94. Richards, AN., and Plant, O. H Urine production in the perfused kidney: The influence of adrenalin on the volume of the perfused kidney. *Am. J. Physiol.* 59, 184-190 (1922).
95. Richards, AN., and Plant, O. H Urine formations in the perfused kidney. The influence of alterations in renal blood pressure on the amount and compositions of urine. *Am. J. Physiol.* 59, 144-183 (1922).
96. Richardson, G.S., and Ulfelder, H E experiences with a simplified method of small organ perfusion. *Surgery* 48, 237-243 (1960).

97. Robb, J.S.. Maintenance of perfused mammalian hearts. *Circulation Res.* 1, 184-185 (1953).
98. Rosenberger, A. An electromagnetic pump. *Science* 71, 463-464 (1930).
99. Salmon, P.A. Perfusion of the isolated canine stomach. *Surg. Forum* 14, 325-326 (1963).
100. Shatkin, S., Anthone, R., S., and MacNeill, A.E. Organ perfusion: Maintenance of function of canine kidneys in vitro by a new perfusion technique. *Plastic Reconstruct. Surg.* 29, 167-175 (1962).
101. Slapak, M., Wigmore, R.A., and MacLean, L.D. Twenty-four hour liver preservation by the use of continuous pulsatile perfusion and hyperbaric oxygen. *Transplantation* 5, 1154-1158 (1967).
102. Starling, E. H., and Verney, E.B. The secretion of urine as studied on the isolated kidney. *Proc. Roy. Soc.* 97, 321-363 (1925).
103. Suda, I., Adachi, C., and Kito, K. Studies on the isolated cat's brain in vitro. *Kobe J. Med. Sci.* 9, 41-67 (1963).
104. Veith, F.J., Dyesine, M., Nehlsen, S.L., and Karl, R.C. Preservation of pulmonary function, hemodynamics, and morphology in isolated perfused canine lungs. *J. Thoracic Cardiovascular Sug.* 52, 437-441 (1966).
105. Veith, F.J., Hagstrom, J.W.C., Nehlsen, S.L., Karl, R.C., and Deyesine, M. Functional hemodynamic, and anatomic changes in isolated perfused dog lungs; the importance of perfusate characteristics. *Ann. Surg.* 165, 267-278 (1967).
106. Verney, E.B., and Starling, E. H. On secretion by the isolated kidney. *J. Physiol. (London)* 56, 353-358 (1922).
107. Voroncy, U.U. Transplantation of preserved cadaver kidney as a method of biostimulation severe nephritides. *Vachehnoe Delo* 9, 814-816 (1950).

108. Webb, W.R., Dodds, R.P., Unal, M.O., Karow, A.M., Cook, W.A., and Daniel, C.R. Suspended animation of the heart with metabolic inhibitors. Effect of magnesium sulfate of fluorides and adrenochrome in rats. *Ann.Surg.* 164, 343-350 (1966).
109. Werthessen, V.T.A technique or gan culture for protected metabolism studies. *Endocrinology* 44, 109-126 (1949).
110. White, R.J., Albin, S.M., and Verdura, J. Preservation of viability in the isolated monkey brain utilizing a mechanical extracorporeal circulation. *Nature* 202, 1082-1083 (1964).
111. White, R.J., Albin, M.S., Verdura, J., and Locke, G., The isolated monkey brain: Operative preparation and desing of support systems. *JNeurosurg.* 27, 216-225 (1967).
112. White, R.J., Albin, M.S., Davidson, E., and Yashon, D. Production of lactate and pyruvate by the brain: Accumulation of lactate and pyruvate in the recycling circulation of the isolated brain. *Surgery* 64, 60-67 (1968).
113. White, R.J., and Albin, M.S. Mechanical circulatory support of the isolated brain. In *Organ Perfusion and Preservation* (J.C. Norman, ed), pp. 747-757. Appleton, New York, 1968.

